

---

# **Charakterisierung der Interaktion von Sam68 mit SH3-Domänen – Implikationen für die HIV-Replikation**

---

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG  
DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III –  
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von  
**Benedikt ASBACH**  
aus Regensburg

im Januar 2010

Promotionsgesuch eingereicht am: 12. Januar 2010

Datum der mündlichen Prüfung: 5. Mai 2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Ralf Wagner

**Prüfungsausschuss:**

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Gernot Längst

Prüfer: Prof. Dr. Herbert Tschochner

Prof. Dr. Ralf Wagner

Prof. Dr. Richard Warth

Die vorliegende Arbeit wurde selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

---

Benedikt Asbach

**Meinem Vater**

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>2</b>
1.1 Die Src-Kinasen .....	2
1.2 Virus-Wirt-Interaktionen bei HIV .....	6
1.3 Sam68 .....	11
1.4 Phagen-Display .....	18
1.5 Zielsetzung .....	21
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Molekularbiologie .....	22
2.2 Phagen-Display .....	23
2.2.1 Produktion von Phagen-Überständen .....	23
2.2.2 Titration .....	24
2.2.3 Bio-Panning .....	24
2.2.4 Phagen-ELISA .....	26
2.3 Proteinbiochemie .....	27
2.3.1 Protein-Expression in <i>E. coli</i> .....	27
2.3.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen .....	27
2.3.3 Aufreinigung von His-Fusionsproteinen .....	28
2.3.4 Proteinbestimmung .....	29
2.3.5 SDS-PAGE .....	29
2.3.6 Western-Blot-Analyse .....	29
2.3.7 Pull-Down-Assay .....	30
2.3.8 p24-ELISA .....	31
2.4 Zellbiologie .....	32
2.4.1 Zelllinien und Kultivierung .....	32
2.4.2 Transfektion .....	32
2.4.3 Zelllysate .....	32
2.4.4 FACS-Analyse .....	33
2.4.5 Fluoreszenzmikroskopische Analyse .....	35
2.4.6 HIV-Replikations-Assay .....	36
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1 Identifizierung und Charakterisierung von Sam68-SH3-Bindern .....	37
3.1.1 Herstellung von Sam68 .....	37
3.1.2 Herstellung der SH3-Phagen-Bibliothek .....	38
3.1.3 Qualitätskontrolle der SH3-Phagen-Bibliothek .....	39
3.1.4 Bio-Panning zur Identifizierung von Sam68-SH3-Wechselwirkungen .....	40
3.1.5 Phagen-ELISA zur quantitativen Analyse der Sam68-SH3-Interaktionen .....	43
3.1.6 Pull-Down-Assay zur Untersuchung der Sam68-SH3-Interaktionen <i>in vitro</i> .....	46
3.1.7 FRET-Analyse zur Untersuchung der Sam68-SH3-Interaktionen <i>in vivo</i> .....	48
3.1.8 Zusammenfassung .....	51

3.2 Beteiligung von Sam68-SH3-Interaktionen an der HIV-Replikation .....	52
3.2.1 Identifizierung der SH3-Bindestellen in Sam68 .....	52
3.2.2 Generierung von Sam68- $\Delta$ Px-Mutanten.....	55
3.2.3 Charakterisierung der Sam68- $\Delta$ Px-Mutanten mittels FRET .....	58
3.2.4 Einfluss der Überexpression von Sam68 $\Delta$ Px auf die HIV-Replikation .....	59
3.2.5 Komplementierung des Sam68 $\Delta$ C-vermittelten Effekts.....	61
3.2.6 Zusammenfassung .....	62
3.3 Entwicklung eines SH3-basierten HIV-Inhibitors.....	63
3.3.1 Affinitätssteigerung der Yes-SH3-Domäne.....	64
3.3.2 Charakterisierung von Yes-opt.....	65
3.3.3 Subzelluläre Lokalisation der SH3-Domänen.....	67
3.3.4 Einfluss der SH3-Domänen ohne NES auf die HIV-Replikation.....	69
3.3.5 Einfluss der SH3-Domänen mit NES auf die HIV-Replikation .....	72
3.3.6 Zusammenfassung .....	74
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>75</b>
4.1 Interaktion von Sam68 mit SH3-Domänen.....	75
4.1.1 Identifizierung Sam68-bindender SH3-Domänen.....	76
4.1.2 Analyse der Affinitäten von Sam68-SH3-Interaktionen .....	77
4.1.3 Analyse der Selektivität von Sam68-SH3-Interaktionen.....	81
4.1.4 Implikationen von Sam68-SH3-Interaktionen in zellulären Prozessen.....	84
4.2 Sam68-SH3-Interaktionen im Rahmen der HIV-Replikation .....	86
4.2.1 Keine Beteiligung von Sam68-SH3-Interaktionen an der HIV-Replikation .....	86
4.2.2 SH3-basierte Inhibition der HIV-Replikation .....	88
4.3 Ausblick.....	92
<b>5. Anhang.....</b>	<b>93</b>
5.1 Abkürzungsverzeichnis .....	93
5.2 DNA-Konstrukte .....	94
5.2.1 Oligonukleotide.....	94
5.2.2 Ausgangskonstrukte .....	96
5.2.3 Klonierungen .....	98
5.3 SH3-Phagen-Bibliothek.....	102
5.4 Das Programm »SH3Seq«.....	105
5.5 Literaturverzeichnis .....	107
<b>Danksagung .....</b>	<b>111</b>

## Zusammenfassung

---

Das Protein Sam68 (*src-associated in mitosis*, 68 kDa) ist an vielen zellulären Prozessen wie z. B. der Zellzyklus- oder Apoptose-Regulation beteiligt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es für den RNA-Metabolismus des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) von Bedeutung ist, wobei verschiedene Mechanismen diskutiert werden. Sam68 besitzt eine zentrale RNA-Bindungsdomäne, die von unstrukturierten Bereichen mit zahlreichen Andockstellen für Signaltransduktionsproteine flankiert wird. Dazu gehören sieben Prolin-reiche Sequenzen (P0 bis P6) mit Kern-PxxP-Motiv, die als potentielle Bindestellen für SH3-Domänen fungieren. Zwar wurden in der Literatur bereits einige Proteine beschrieben, die SH3-vermittelt an Sam68 binden, aber eine systematische Analyse des SH3-Bindungsprofils wurde bislang nicht durchgeführt.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Phagen-Display-Verfahren unter Einsatz einer Bibliothek, die alle humanen SH3-Domänen abbildet, durchgeführt. Dabei wurden mehr als 30 potentielle Sam68-Binder identifiziert. Unter den neun Domänen, die mit höchster Affinität gebunden hatten, befanden sich sechs bereits bekannte (Fyn, Lyn, Nck1, p85 $\alpha$ , Src und Yes) sowie drei erstmals als Binder beschriebene SH3-Domänen (Hck, Intersectin 2, OSF1). Wegen der beobachteten Breite an Interaktionspartnern wird vorgeschlagen, Sam68 als Scaffold-Protein zu betrachten. Die detaillierte Charakterisierung dieser SH3-Domänen ergab, dass ihnen nur die Sam68-Motive P0, P3, P4 und P5 als Andockstellen dienen.

Um festzustellen, ob Sam68-SH3-Wechselwirkungen eine Rolle im Rahmen der HIV-Replikation spielen, wurden Sam68-Mutanten ohne die relevanten SH3-Bindestellen erzeugt (Sam68 $\Delta$ Px). Die Überexpression von Sam68 $\Delta$ Px während der HIV-Replikation hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Partikelproduktion. In einem System mit funktionellem Knock-down des endogenen Sam68 durch die Mutante Sam68 $\Delta$ C erwiesen sich die Sam68 $\Delta$ Px-Mutanten als genauso wirksam wie das Wildtyp-Protein zur Komplementierung des Sam68 $\Delta$ C-Defekts. Sam68-SH3-Interaktionen sind also höchstwahrscheinlich entbehrlich für die Funktion, die Sam68 während der HIV-Replikation wahrnimmt.

Die Expression der hoch-affinen SH3-Domäne Yes und seiner Variante Yes-opt (60-fach höhere Affinität) führte hingegen zu einer starken Beeinträchtigung der Partikelproduktion im HIV-Replikations-Assay. Höchstwahrscheinlich binden diese isolierten SH3-Domänen an Sam68 und stören die Komplexbildung mit anderen wichtigen Komponenten. Die SH3-Domänen stellen also interessante Kandidaten für eine potentielle HIV-Gentherapie dar, da sie gegen ein zelluläres, aber für das Virus essentielles Protein gerichtet sind. Varianten der SH3-Domänen mit zusätzlich angefügter Kernexportsequenz mit dem Ziel, die subzelluläre Lokalisation von Sam68 zu verändern, wiesen ebenfalls eine starke antivirale Wirkung auf, was sich jedoch als Sam68-unabhängiger Effekt herausstellte.

# 1. Einleitung

---

## 1.1 Die Src-Kinasen

---

Für die Entdeckung **Tumor-induzierender Viren** erhielt Peyton Rous 1966 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Dem Pathologen gelang 55 Jahre zuvor der Nachweis, dass sich der Auslöser eines Geflügelsarkoms mittels zellfreier Extrakte auf andere Hühner übertragen liess [1]. Wie sich herausstellte, handelte es sich bei diesem Auslöser um ein Retrovirus, das nach seinem Entdecker »Rous Sarkom-Virus« (RSV) genannt wird. Dieses Virus besitzt die Fähigkeit, Hühnerfibroblasten in Zellkultur zu transformieren, was morphologisch durch eine Abrundung der Zellen charakterisiert ist [2]. Weitere Untersuchungen an RSV und verschiedenen Mutanten des Virus ergaben, dass die Fähigkeit zur Transformation eine genetisch trennbare Eigenschaft ist. Das Genom von RSV hat gegenüber anderen Retroviren anstelle der üblichen Gliederung *gagpol-env* die Struktur *gagpol-env-src*, wobei *src* für das Sarkom-auslösende Tumorgen steht, *gagpol* für die retroviralen Strukturproteine und *env* für das Hüllprotein [3].

In den 70er Jahren erkannten BISHOP und VARMUS, dass das virale *src*-Gen ursprünglich aus einer Wirtszelle stammt [4]. Das zelluläre Gen, *c-src*, ist demnach ein sog. Proto-Oncogen (allg. *c-onc*), das im Laufe der viralen Evolution vom RSV-Vorläufer aufgenommen und durch Mutationen zum Transformations-aktiven viralen *v-src* **Oncogen** (allg. *v-onc*) wurde – eine Entdeckung, die 1989 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Mit der Entschlüsselung der Sequenz des *src*-Gens [5] begann man schliesslich die Biologie des Src-Proteins zu verstehen.

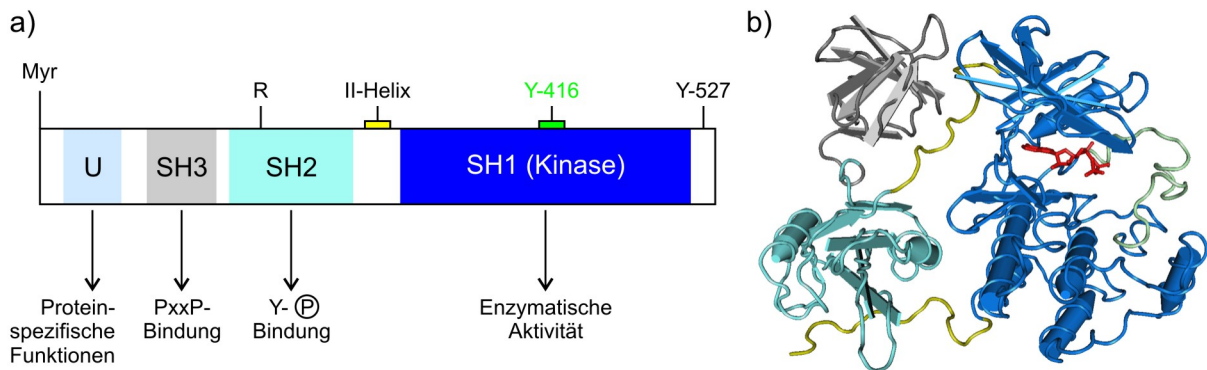
Beim Menschen gehört *src* zu einer Genfamilie, die insgesamt 11 Mitglieder mit variierender Gewebsexpression umfasst (siehe Tab. 1.1) [6]. Die zugehörigen Proteine haben eine charakteristische Domänenstruktur, bestehend aus vier homologen Domänen (*src-homology domains 1-4*, kurz SH1 bis SH4) sowie jeweils einer speziellen (*unique*) Domäne, die Protein-spezifische Funktionen vermittelt [7]. Der allgemeine Aufbau ist schematisch in Abb. 1.1 dargestellt.

**Tabelle 1.1 Die Familie der Src-Kinasen**

Name	Gewebsexpression
Src	Ubiquitär
Yes	
Fyn	
Fgr	B- und myeloide Zellen
Lyn	Gehirn, B- und myeloide Zellen
Hck	Myeloide Zellen
Lck	Gehirn, T-Zellen, NK-Zellen
Blk	B-Zellen
Brk	Darm, Prostata
Frk	Gehirn, Darm, Brustgewebe, Blase, Lymphatisches System
Srm	Keratinocyten

Bei der SH4-Domäne handelt es sich um den myristylierten N-Terminus, der für die Lokalisation der Proteine zur Plasma-Membran verantwortlich ist. Die SH3- und SH2-Domänen sind in der Lage durch Bindung an Prolin-reiche Sequenzen bzw. an Phosphotyrosin-Reste Protein-Protein-Wechselwirkungen zu vermitteln. Die SH1-Domäne

besitzt enzymatische Aktivität als Tyrosin-Kinase, weshalb die Proteinfamilie als »Src-Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen«, kurz **Src-Kinasen** oder SFKs, bezeichnet wird.



**Abb. 1.1 Struktur der Src-Kinasen**

**a)** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Src-Kinasen. U = *unique*-Domäne, Myr = Myristylierungsstelle, R = konserviertes Arginin der SH2-Domäne, das ggf. mit Y-527 am C-Terminus interagiert, II-Helix = Polyprolin Typ II-Helix im Linkerbereich, die ggf. mit der SH3-Domäne interagiert, Y-416 = regulatorisches Tyrosin im Aktivierungs-loop (grün)  
**b)** Struktur der Src-Kinase im autoinhibierten Zustand (2SRC, [8]). Die SH3-Domäne (grau) bindet an die Typ II-Helix im zentralen Linkerbereich (gelb), die SH2-Domäne (hellblau) an das Phosphotyrosin 527 im C-Terminus. SH1-Domäne (dunkelblau) mit Aktivierungsloop (grün) und gebundenem ATP (rot).

Aufgrund zahlreicher biochemischer Analysen und der Strukturaufklärung der Src-Kinasen ist inzwischen sehr gut verstanden, wie die enzymatische Aktivität dieser Proteine reguliert wird. Die beiden Tyrosin-Reste Y-416 im sog. Aktivierungs-loop der Kinase und Y-527 am C-Terminus spielen dabei eine kritische Rolle. Im inaktiven Zustand (vgl. Abb. 1.1b) ist nur Y-527 phosphoryliert, das eine schwache intramolekulare Wechselwirkung mit der SH2-Domäne eingeht, so dass eine geschlossene Konformation mit inaktiver Kinase vorliegt. Stabilisiert wird die Struktur zusätzlich durch eine intramolekulare Wechselwirkung der SH3-Domäne mit einer Helixstruktur im Linker-Bereich. Die Bindung der SH2- oder SH3-Domäne an andere Liganden führt zur Freisetzung des C-Terminus, wodurch Y-527 dephosphoryliert wird. Infolgedessen nimmt das Protein eine offene Konformation an, der Aktivierungs-loop kann sich entfalten und Y-416 wird autokatalytisch in einer *trans*-Phosphorylierungs-Reaktion phosphoryliert. Dadurch erlangt die Kinase volle Aktivität und kann nun *Downstream*-Signalmoleküle phosphorylieren (zur Übersicht siehe [9]).

Die Aktivierung von Src führt einerseits durch Modifikationen im Cytoskelett zu morphologischen Veränderungen der Zelle, andererseits durch Aktivierung von Signalwegen zur Mitogenese [10]. Eine Deregulation von Src, die zu einer konstitutiv aktiven Kinase führen würde, hätte also das Potential zur Tumorigenese, weshalb *c-src* auch als Proto-Oncogen eingestuft wird. Tatsächlich stellte sich heraus, dass das *v-Src* von RSV entsprechend dereguliert ist: Durch eine Deletion der sieben C-terminalen Aminosäuren ging



auch das regulatorische Y-527 verloren, so dass v-Src keine geschlossene Konformation mehr annehmen kann [11].

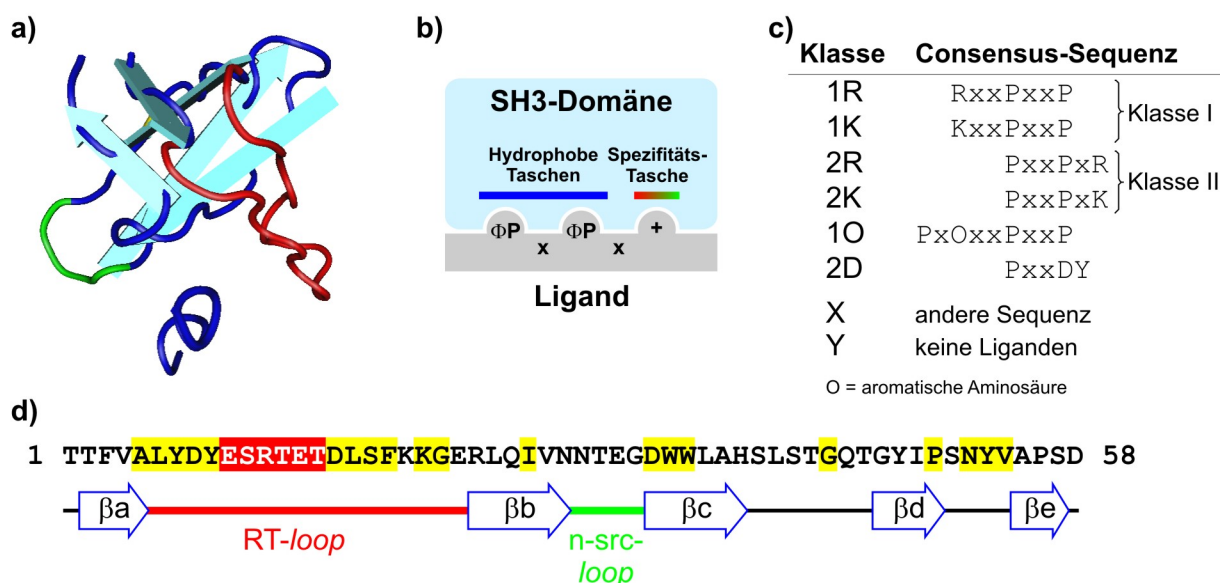
Die Familie der Src-Kinasen vermittelt pleiotrope Effekte in verschiedenen Zelltypen und Entwicklungsstadien (für eine detaillierte Übersicht siehe [12]). Generell findet man SFKs in einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen. Lck und Fyn werden z. B. nach Stimulierung des T-Zell-Rezeptors aktiviert und phosphorylieren Adapterproteine wie ZAP-70, die das Signal weiterleiten [13]. Studien an Knock-out-Mäusen haben ergeben, dass diese beiden Kinasen zudem essentiell für die T-Zell-Entwicklung sind. Die Phänotypen anderer SFK-Knock-out-Mäuse verdeutlichen die Vielfältigkeit der Proteinfamilie: Während z. B. die Yes-Deletion alleine keinen Effekt hat, führt der Src-Knock-out zu einer funktionellen Störung von Osteoclasten, was eine ausgeprägte Osteopetrose zur Folge hat, die bald nach der Geburt zum Tod führt. Der Doppel-Knock-out von Yes und Src ist embryonal letal, woraus sich folgern lässt, dass diese SFKs teilweise redundante, aber auch spezifische Funktionen haben [14].

Bald nach der Charakterisierung der verschiedenen SH-Domänen stellte sich heraus, dass die einzelnen Src-Homologie-Domänen nicht nur in Src-Kinasen vorkommen, sondern in unterschiedlichen Kombinationen in einer ganzen Reihe von Proteinen, die in Signaltransduktions-Netzwerken involviert sind. Dies führte zum sog. »Konzept der modularen Signaldomänen« [15]. Da SH3-Domänen eine zentrale Rolle in der vorliegenden Arbeit spielen, werden sie im Folgenden näher beschrieben.

**SH3-Domänen** bestehen aus etwa 60 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von ca. 7 kDa. Sie binden, wenn auch mit relativ niedriger Affinität und Selektivität, an Prolin-reiche Sequenzen [16]. Die Dissoziationskonstanten liegen typischerweise im niedrigen mikromolaren Bereich, in Ausnahmefällen aber auch deutlich darunter, z. B. 250 nM für die Interaktion von Hck mit dem HI-viralen Nef-Protein [17]. Beim Menschen kommen ca. 300 verschiedene SH3-Domänen vor, bei der Hefe ca. 25, und auch bei Bakterien konnten SH3-Domänen nachgewiesen werden [18,19].

Abb. 1.2a zeigt die NMR-Struktur der Src-SH3-Domäne [20] im Komplex mit einem synthetischen Liganden. Die Sequenz ist in Abb. 1.2d unter Angabe der Sekundärstrukturelemente dargestellt; hoch-konservierte Aminosäuren sind gelb hinterlegt. Der Kern der Domäne wird von fünf antiparallelen  $\beta$ -Strängen gebildet. Die Liganden beinhalten meistens ein  $\Phi$ Px $\Phi$ P-Consensus-Motiv (kurz »PxxP-Motiv«), das eine links-gängige Polyprolin-Helix vom Typ II ausbildet. Die beiden  $\Phi$ P-Dipeptide ( $\Phi$  steht für hydrophobe Aminosäuren) werden von zwei hydrophoben Taschen der SH3-Domäne gebunden (siehe Abb. 1.3b). Diese Interaktion leistet den Hauptbeitrag zur Bindung, vermittelt jedoch nur wenig Selektivität, weil das PxxP-Motiv in den meisten Liganden vorkommt. Hinzu kommt,

dass das PxxP-Motiv aufgrund seiner Symmetrie potentiell in zwei Orientierungen von der SH3-Domäne gebunden werden kann. Für die selektive Erkennung von Liganden ist daher die sog. Spezifitäts-Tasche entscheidend, die v. a. von Resten des RT- und des n-src-loops gebildet wird. Diese *loops* sind stellenweise hoch-variabel (exemplarisch für Src in Abb. 1.4d rot hervorgehoben) und unterscheiden sich bei verschiedenen SH3-Domänen auch stark in ihrer Länge (RT-loop 15 - 31, meist 18; n-src-loop 3 - 31, meist 4 Aminosäuren). Oft findet sich im RT-loop eine saure Aminosäure, die Kontakt mit einer basischen Aminosäure im Liganden aufnimmt. Letztere legt die Orientierung der Ligandenbindung fest. Liegt sie N-terminal, spricht man von einem Klasse I-Motiv (+xxPxxP-Consensus-Sequenz; + steht für R oder K), liegt sie C-terminal, von einem Klasse II-Motiv (PxxPx+-Consensus-Sequenz). Zwar machen diese beiden Typen den Grossteil der SH3-Liganden aus, aber es sind auch Beispiele bekannt, bei denen andere Motive vorliegen, z.B. eine grosse aromatische anstelle der basischen Aminosäure in Klasse I-Motiven bei den Liganden der Abl-Familie (Klasse 1O-Motive). Schliesslich wurden auch SH3-Domänen beschrieben, die Liganden ohne PxxP-Motiv binden (Klasse X-Motive), wie z. B. PxxDY bei SH3-Domänen der Eps8-Familie (Klasse 2D), und solche, für die noch kein Ligand bekannt ist (Klasse Y-Motive). Nach CESARENI *et al.* lassen sich insgesamt 8 Liganden-Klassen definieren (siehe Abb. 1.2c) [21]. Neben den SH3-Domänen gibt es auch noch weitere Protein-Domänen, die mit Prolin-reichen Sequenzen interagieren, nämlich die sog. WW-Domänen, EVH1-Domänen, GYF-Domänen, UEV-Domänen und das Profilin [22,23].



**Abb. 1.2 Interaktion von SH3-Domänen mit PxxP-Liganden**

- Struktur der Src-SH3-Domäne; rot: RT-loop, grün: n-src-loop, 1RLQ [20].
- Schematische Darstellung der Interaktion von SH3-Domänen über zwei hydrophobe Taschen und die Spezifitäts-Tasche mit den entsprechenden Motiven im Liganden.
- Klassifizierung der SH3-Liganden in 8 Gruppen gemäss [21].
- Sequenz der humanen Src-Kinase mit Angabe der Sekundärstrukturelemente; gelb: konservierte Aminosäuren, rot: hoch-variable Aminosäuren des RT-loops, blaue Pfeile symbolisieren die  $\beta$ -Stränge.

## 1.2 Virus-Wirt-Interaktionen bei HIV

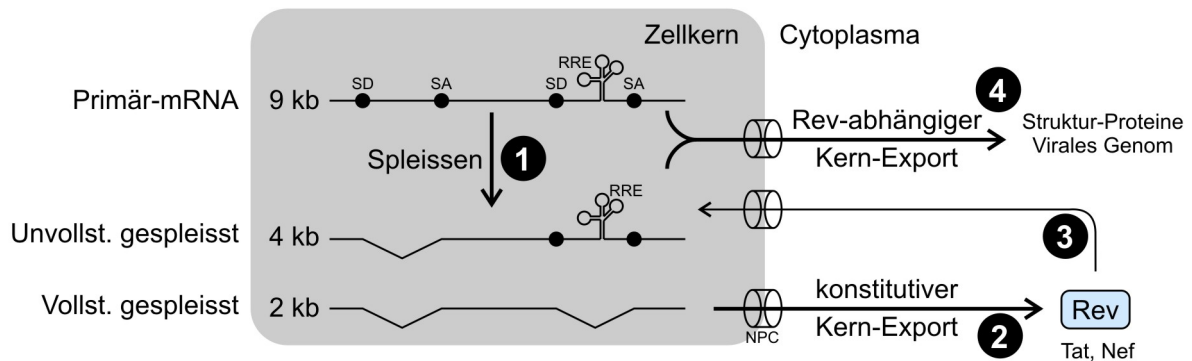
Das humane Immundefizienzvirus (HIV) stellt als Auslöser des erworbenen Immundefizienzsyndroms (AIDS) eines der grössten Gesundheitsprobleme der Welt dar. Laut Schätzungen der Organisation UNAIDS waren 2008 ca. 33 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Die Anzahl an Neuinfektionen belief sich auf 2,7 Millionen, 1,9 Millionen davon erfolgten im südlich der Sahara gelegenen Teil Afrikas [24].

Zwar ist es mit der heute verfügbaren hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) möglich, das Fortschreiten der Infektion zu verhindern oder zumindest stark zu verlangsamen, aber eine Eradikation des Virus ist nach wie vor nicht möglich, weil es im Körper bislang nicht erreichbare Virus-Reservoirs gibt. Problematisch sind zudem die Nebenwirkungen, die sich bei potentiell lebenslanger Einnahme der Medikamente ergeben sowie die Entstehung resistenter Virus-Varianten. Ausserdem können aus wirtschaftlichen und politischen Gründen, insbesondere in den armen Ländern, nach wie vor nicht alle HIV-Infizierten mit Medikamenten versorgt werden.

Für eine detaillierte Beschreibung des HI-viralen **Lebenszyklus** sei auf die entsprechenden Fachbücher (z. B. [25,26]) und Übersichts-Artikel verwiesen (z. B. [27]). Kurz zusammengefasst beginnt der HI-virale Lebenszyklus mit dem Andocken des Viruspartikels mittels der Env-Oberflächenproteine an den zellulären Rezeptor CD4 und einen Corezeptor (CCR5 oder CXCR4) auf T-Helferzellen. Nach Aufnahme in Endosomen fusioniert die virale Hüllmembran mit der Vesikel-Membran [28], was die Freisetzung des Virus-Capsids ins Cytoplasma zur Folge hat. Dort wird zunächst das virale RNA-Genom durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Diese ist Teil des sog. Präintegrations-Komplexes, der anschliessend unter Beteiligung zellulärer Co-Faktoren in den Zellkern transportiert wird, wo die virale Integrase den Einbau der viralen DNA ins Genom der Zelle katalysiert und damit den Infektionsprozess abschliesst.

Die Replikation beginnt mit der Transkription des viralen Genoms in eine einzige prä-mRNA (ca. 9 kb) durch die RNA-Polymerase II. Die RNA wird in mehrere kleine mRNAs alternativ gespleisst (2 kb-Klasse, Intron-frei), die konstitutiv aus dem Kern exportiert werden, wo die Translation zu den viralen Proteinen Nef, Tat und Rev stattfindet. Bei Nef handelt es sich um den wichtigsten Pathogenitätsfaktor, der im Patienten für das Fortschreiten zu AIDS verantwortlich ist. Nef besitzt keine enzymatische Aktivität, greift aber durch eine grosse Zahl von Protein-Protein-Interaktionen in viele zelluläre Prozesse ein. Bei Tat handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription des viralen Genoms stark steigert. Rev ist ein Shuttleprotein, das an ein RNA-Sekundärstrukturelement, das sog. *Rev-responsive element* (RRE), in einem Intron der viralen RNA bindet, wodurch es die einfach-gespleisssten RNAs (4 kb-Klasse) und die ungespleissste RNA zur CRM1-Exportmaschinerie dirigiert, so

dass auch diese Intron-haltigen RNAs den Kern verlassen können. Sie dienen dann im Cytoplasma zur Synthese der viralen Strukturproteine Gag, GagPol und Env sowie im Falle der ungespleisssten RNA als Genom für die neuentstehenden Virus-Partikel. Der RNA-Metabolismus ist schematisch in Abb. 1.3 zusammengefasst. Gag und GagPol induzieren einen Assemblierungsprozess, der letztendlich zur Freisetzung von Vorläufer-Viruspartikeln führt. Die virale Protease prozessiert schliesslich die Gag- und GagPol-Proteine in die einzelnen Untereinheiten, wodurch die Reifung infektiöser Partikel abgeschlossen wird.



**Abb. 1.3 RNA-Metabolismus von HIV-1**

Durch alternatives Spleissen (1) entstehen aus der 9 kb-langen Primär-RNA die RNAs der 4 kb-Klasse (unvollständig gespleisst, Intron-haltig) und der 2 kb-Klasse (vollständig gespleisst, Intron-frei); SD = Spleiss-Donor-, SA = Spleiss-Akzeptorstelle. Letztere werden konstitutiv durch Kernporen-Komplexe (NPC) aus dem Zellkern exportiert (2), wo sie u.a. zum Shuttle-Protein Rev translatiert werden. Rev kehrt in den Zellkern zurück (3) und bindet an die RRE-Sekundärstruktur in den Introns der 9 kb- und 4 kb-RNAs, welche dann über den CRM1-Weg exportiert werden, um als virales Genom bzw. als Vorlage zur Synthese der Strukturproteine zu dienen.

Die gezielte Störung verschiedener Schritte des viralen Vermehrungszyklus ist die Basis der **HAART-Therapie**, für die derzeit etwa 20 Medikamente aus 5 Klassen zur Verfügung stehen (siehe Tab. 1.2). Um das Auftreten von Resistenzen zu verhindern, hat sich eine Kombinationstherapie mit drei Medikamenten aus mind. zwei Klassen als optimal erwiesen [29].

**Tabelle 1.2 Antiretrovirale Medikamente**

Klasse	Beispiele
NRTIs = Nucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren	Azidothymidin, Lamiduvir
NNRTIs = Nicht-nucleosidische Reverse-Transkriptase Inhibitoren	Efavirenz
PIs = Protease-Inhibitoren	Atazanavir, Saquinavir
Integrase-Inhibitoren	Raltegravir
Entry-Inhibitoren	Enfuvirtide, Maraviroc

Wie man der Tabelle entnehmen kann, sind fast alle Medikamente gegen die HI-viralen Enzyme (Reverse Transkriptase, Protease, Integrase) gerichtet. Die Ausnahme bilden hier die beiden *Entry*-Inhibitoren, wobei Enfuvirtide gegen das virale Env-Protein gerichtet ist, Maraviroc hingegen gegen den zellulären Corezeptor CCR5 [30]. Maraviroc blockiert durch Bindung an CCR5 die Wechselwirkung mit Env, wodurch ein stabiles Andocken des Virus

unmöglich wird. Entscheidend ist hierbei, dass CCR5 im Körper nicht essentiell ist, was u. a. dadurch belegt ist, dass es Menschen gibt, die keinen funktionellen CCR5-Rezeptor exprimieren (sog. CCR5 $\Delta$ 32-Mutation mit vorzeitigem Stop-Codon), was ihnen eine natürliche Immunität gegenüber HIV verleiht [31]. Zu betonen ist, dass Maraviroc damit das erste – und bislang einzige – Medikament ist, das gegen ein zelluläres und nicht gegen ein virales Ziel gerichtet ist, wodurch eine Resistenzbildung durch das Virus äusserst unwahrscheinlich ist. Allerdings gibt es HIV-Varianten, die andere Corezeptoren wie z. B. CXCR4 nutzen.

Weil durch die Therapie keine Eradikation des Virus möglich ist, wird zur Bekämpfung der HIV-Pandemie nach anderen Möglichkeiten gesucht (zur Übersicht siehe [32]). Bislang haben sich Aufklärungskampagnen zur Verhaltensänderung als am wirksamsten erwiesen, doch die Umsetzung ist oft – auch hierzulande – unzureichend, da sie alle gefährdeten Personen erreichen und kontinuierlich durchgeführt werden müssen. Gegenstand aktueller Forschung sind die Anwendung medikamentöser Prä- oder Post-Expositionsprophylaxen sowie die Entwicklung von Mikrobiziden. Die grösste Hoffnung wird aber nach wie vor in die Entwicklung von Impfstoffen gesetzt. Präklinische Studien von Impfstoff-Kandidaten in nicht-menschlichen Primaten ergaben zwar vielversprechende Ergebnisse, aber die erfolgreiche Anwendung beim Menschen steht noch aus. Derzeit werden viele Impfstoff-Kandidaten in klinischen Studien der Phasen I - III getestet, wobei kürzlich erstmals ein moderater Schutz bei einer in Thailand durchgeführten Phase-III-Studie beobachtet wurde [33].

Eine weitere Möglichkeit zur Behandlung der HIV-Infektion, und eventuell auch zur Prophylaxe, stellt die **Gentherapie** dar. Dabei sollen durch Einbringen eines Transgens HIV-infizierte Zellen zerstört oder die HIV-Replikation blockiert werden. Unterschiede bestehen hinsichtlich der Wahl der Zielzellen, des Vektorsystems und der Art des eingesetzten Transgens (zur Übersicht siehe [34-36]).

Ziel des Gentransfers sind entweder CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen oder CD34<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup> hämatopoetische Stammzellen (HSCs), die grundsätzlich nach Entnahme *ex vivo* transformiert und anschliessend wieder in den Patienten reinfundiert werden. Die Verwendung beider Zelltypen hat Vor- und Nachteile. Während sich T-Zellen leicht gewinnen und reinfundieren lassen, muss eine grössere Zahl ( $> 10^{10}$ ) modifiziert werden, um später im Patienten eine signifikante Population transgener Zellen zu erhalten (derzeit bis ca. 1 %). Ausserdem wird dadurch nur ein Teil des T-Zell-Repertoires erreicht. HSCs bieten v. a. den Vorteil, dass von ihnen alle von HIV betroffenen Zelltypen abstammen, neben T-Zellen also auch Makrophagen, dendritische Zellen u. a.. Als Stammzellen besitzen sie ein hohes regeneratives Potential, so dass sich bereits durch Modifizierung von etwa  $10^8$  Zellen Modifizierungsraten bis 10 % erreichen lassen. Ausserdem können sie potentiell zur Regeneration des gesamten

T-Zell-Repertoires beitragen. Allerdings ist zur erfolgreichen Reimplantation meist eine Chemotherapie nötig und es besteht die Gefahr der Oncogenese [34].

Meistens werden die Transgene durch Replikations-inkompetente virale Vektorsysteme in die Zielzellen eingebracht. Verbreitet sind vor allem die Verwendung muriner  $\gamma$ -retroviraler (z. B. Murines Leukämie-Virus) und von HIV abgeleiteter lentiviraler Systeme [37].  $\gamma$ -Retroviren werden v. a. aufgrund der längeren Erfahrung im Rahmen von Gen-Therapie-Ansätzen eingesetzt. Im Gegensatz zu den Lentiviren haben sie aber insbesondere den Nachteil, nur proliferierende Zellen infizieren zu können, so dass eine Stimulierung der Zellen in Kultur erforderlich wird, was sich wiederum negativ auf deren Überleben auswirkt. Bezüglich der Sicherheit bestehen bei murinen  $\gamma$ -Retroviren Bedenken wegen des oncogenen Potentials, bei Lentiviren wegen der potentiellen Rekombination zu Replikations-kompetenten Viren, was sich allerdings durch moderne Vektorsysteme minimieren lässt.

Bei der Wahl des Transgens unterscheidet man cytotoxische und antivirale Gene. Erstere sollen HIV-infizierte Zellen spezifisch zerstören, z. B. durch Tat-abhängige Expression eines Suizidgens wie der Herpes simplex-Thymidinkinase. Das Hauptaugenmerk liegt aber auf den antiviralen Genen, die nach verschiedenen Systemen klassifiziert werden [34].

Je nachdem, welcher Schritt des viralen Replikationszyklus betroffen ist, unterscheidet man Inhibitoren der Klasse I (frühe Phase von der Infektion bis einschliesslich der Integration), Klasse II (virale Gen-Expression) und Klasse III (Assemblierung und Freisetzung der Viruspartikel). Vorteilhaft ist sicherlich eine Kombination verschiedener Inhibitorklassen in Analogie zur HAART, allerdings gibt es hierzu bislang keine abgeschlossenen Studien.

Nach der Art des Inhibitors unterscheidet man RNA- und Protein-Strategien. Erstere beinhalten den Einsatz von *antisense*-RNAs, Ribozymen und RNAi. Letztere reichen von der Expression intrazellulärer Antikörper-Varianten (*single-chain Fvs*) gegen virale Enzyme über transdominante virale Proteine (z. B. TD-gag, Rev-M10) bis hin zum Angriff auf zelluläre Cofaktoren und dem Einbringen von Restriktionsfaktoren. In Tabelle 1.3 sind Beispiele für einige dieser Mechanismen aufgelistet, die bereits in klinischen Studien zum Einsatz kamen.

**Tabelle 1.3 Beispiele für klinische Studien zur HIV-Gentherapie**

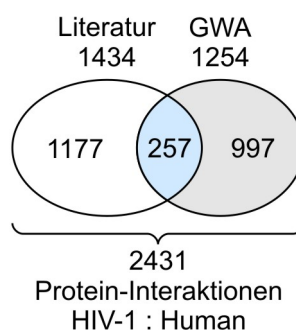
Transgen: Mechanismus	Inhibitor-Typ	Vektor	Zielzellen	Referenz
<b>Rev-M10:</b> Transdominante Rev-Variante mit NES-Defekt blockiert den Export viraler RNAs	Protein Klasse II	Retroviraler Vektor	T-Zellen	[38]
<b>RRE-Decoy:</b> Überexprimierter RRE-Köder konkurriert mit viraler RNA um Bindung an Rev	RNA Klasse II	Retroviraler Vektor	HSCs	[39]
<b>VRX496:</b> <i>antisense</i> -RNA gegen <i>env</i> -Gen blockiert <i>env</i> -Expression	RNA Klasse III	Lentiviraler Vektor	T-Zellen	[40]
<b>maC46:</b> Membran-verankertes Entry-Inhibitor-Peptid verhindert Membran-Fusion	Protein Klasse I	Retroviraler Vektor	T-Zellen	[41]
<b>OZ1:</b> anti-HIV-Ribozym gegen <i>tat</i> - und <i>vpr</i> -RNA zerstört virale RNAs	RNA Klasse II	Retroviraler Vektor	HSCs	[42]

In Analogie zur HAART wäre es auch bei der Gentherapie von Vorteil, zelluläre Proteine anzugreifen, die für die Replikation des Virus essentiell, aber für die Zelle entbehrlich sind. Idealerweise sollte ausserdem das Transgen soweit wie möglich einem zellulären Protein ähneln, damit die exprimierende Zelle nicht vom Immunsystem zerstört wird. Letzteres ist insbesondere ein Problem für transdominante virale Proteine, obgleich inzwischen auch Möglichkeiten untersucht werden, die Prozessierung und Präsentation solcher Proteine zu verhindern, z. B. durch Anfügen einer Gly-Ala-Wiederholungssequenz [43].

Voraussetzung zur Identifizierung potentieller Ziele für die (Gen-)Therapie ist daher eine detaillierte Kenntnis der **Virus-Wirt-Interaktionen** auf molekularer Ebene.

Weil das HIV-Genom nur für 15 Proteine codiert, nutzt das Virus zur Replikation zahlreiche zelluläre Mechanismen aus. Trivialerweise gehören hierzu z. B. die Transkriptions- und Translations-Maschinerien. An vielen Stellen greifen die viralen Proteine modulierend in zelluläre Prozesse ein. So rekrutiert Tat den P-TEFb-Komplex (Cyclin T1/Cdk9), der die Carboxy-terminale Domäne der RNA-Polymerase II phosphoryliert, wodurch die Elongationsrate des HIV-Genoms gesteigert wird [44]. Das virale Nef-Protein vermittelt u. a. die Herunterregulation von MHC Klasse-I-Molekülen von der Zelloberfläche, so dass die Präsentation von Peptiden für cytotoxische T-Zellen reduziert wird und infizierte Zellen leichter der Zerstörung entgehen [45]. Bei diesem Prozess spielen auch SH3-vermittelte Interaktionen eine Rolle [46] – Nef besitzt nämlich ein PxxP-Motif, über das es mit den Src-Kinasen Hck und Lyn interagiert [47].

Den 15 HIV-Proteinen stehen ca. 38000 humane Proteine (RefSeq, Stand Sep. 2009, [48]) gegenüber. Die »HIV-1-Human Protein Interaction Database« [49] verzeichnet derzeit 1434 Interaktionen, die in der Literatur beschrieben wurden. Dieses Spektrum wird durch genomweite Ana-



**Abb. 1.4**  
Anzahl der in der Literatur bzw. in genomweiten Analysen (GWA) beschriebenen Interaktionen zwischen HIV-viralen und zellulären Proteinen (Stand 09/2009)

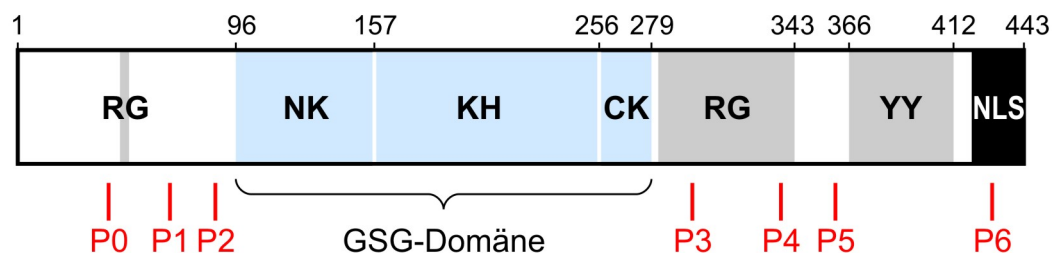
lysen wie die siRNA-Studie von BRASS *et al.* [50] noch erweitert. Gemäss einer Meta-Analyse von neun Studien dieser Art wurden 1254 zelluläre Gene im Zusammenhang mit HIV identifiziert [51]. Die Überlappung mit den Einträgen der HIV-Interaktions-Datenbank beläuft sich dabei zwar nur auf 257, aber damit kommen insgesamt 2431 Wechselwirkungen in Betracht (siehe Abb. 1.4). Darin sind sicherlich etliche falsch-positive und indirekte Wechselwirkungen enthalten, aber die grosse Zahl verdeutlicht die Komplexität der Beziehung zwischen Virus und Wirtszelle.

Eines der Proteine, das aufgrund publizierter Daten unzweifelhaft eine wichtige Rolle im Rahmen der HIV-Replikation spielt, ist Sam68, dessen Interaktionen mit SH3-Domänen Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

### 1.3 Sam68

Zwei Gruppen beschrieben 1994 unabhängig voneinander die Entdeckung eines Proteins, das während der Mitose direkt mit der Src-Kinase interagiert und an Tyrosin-Resten phosphoryliert wird [52,53] und daher als ***src-associated in mitosis, 68 kDa***, kurz **Sam68**, bezeichnet wird [54]. Das Protein besitzt eine KH-Domäne, weshalb es zur »heteronuclear ribonucleoprotein particle K homology«-Familie gezählt und mit dem systematischen Namen »KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1«, kurz KHDRBS1 gelistet wird (NCBI-Nr. NC\_006559). Sam68 besitzt keine enzymatische Aktivität sondern fungiert als Adaptermolekül, das sowohl zahlreiche Protein-Interaktionen eingehen als auch RNA binden kann. Aufgrund dieser funktionellen Eigenschaften wird Sam68 der STAR-Protein-Familie (*signal transduction and activation of RNA metabolism*) zugeordnet [55]. Eine ausführliche Beschreibung von Struktur und Funktion geben LUKONG und RICHARD [56].

Sam68 besteht aus 443 Aminosäuren und hat eine rechnerische Grösse von 48,2 kDa, obwohl es ein apparentes Molekulargewicht von 68 kDa in SDS-PAGE-Analysen aufweist. Abb. 1.5 zeigt schematisch die **Domänenstruktur** des Proteins. Bislang wurde keine 3D-Struktur von Sam68 veröffentlicht, allerdings ist die Struktur einiger homologer KH-Domänen, z. B. von hnRNP K, bestimmt worden, die vermutlich eine ähnliche Faltung annehmen [57]. Die N- und C-terminalen Bereiche dürften gemäss Sekundärstrukturvorhersagen unstrukturiert sein (siehe Abb. 3.15), bis auf die lokale Ausbildung der Polyprolin-Typ II Helices im Bereich der PxxP-Motive.



**Abb. 1.5 Domänenstruktur von Sam68**

Im Zentrum befindet sich die RNA-bindende KH-Domäne, flankiert von je einem N- und C-terminalen konservierten Bereich, NK und CK (blau); am C-Terminus befindet sich ein Kernlokalisationssignal (NLS, schwarz); weiterhin besitzt Sam68 RG-reiche und Tyrosin-reiche-Sequenzen (YY, grau) sowie sieben Prolin-reiche Sequenzen (P0 bis P6, rot).

Die **RNA-Bindung** erfolgt über die zentrale KH-Domäne, die von zwei konservierten Bereichen flankiert ist (N- bzw. C-terminal von KH = NK und CK). Der Bereich wird in seiner Gesamtheit auch als GSG-Domäne bezeichnet, nach den ersten drei Vertretern der Gruppe (GRP33, Sam68, GLD-1) [58]. Aufgrund von *in vitro*-Analysen mit synthetischen Oligonucleotiden wird angenommen, dass Sam68 v. a. an U/A-reiche Sequenzen bindet,



insbesondere die Motive UAAA und UUUA [59] sowie mit hoher Affinität an ein zweiteiliges U(U/A)AA-Wiederholungsmotiv [60]. Bislang konnten mehr als 50 mRNAs identifiziert werden, die von Sam68 gebunden werden, darunter z. B. diejenigen von  $\beta$ -Actin, hnRNP A2/B1 und dem Poly-A-Bindeprotein 1 (PABP1) [61,62]. Posttranslationale Modifikationen von Sam68 (s. u.) können die RNA-Bindung beeinflussen. So führt Tyrosin-Phosphorylierung oder Arginin-Methylierung zu einer Abnahme [63-65], Lysin-Acetylierung hingegen zu einer Verstärkung der RNA-Bindung [66].

Sam68 geht zahlreiche **Protein-Protein-Interaktionen** ein. CHEN *et al.* konnten zeigen, dass Sam68 RNA-abhängig über die KH-Domäne oligomerisiert, höchstwahrscheinlich zu Trimeren [67]. Darüber hinaus kann Sam68 Heterooligomere mit den verwandten Proteinen SLM-1 und SLM-2 (s. u.) ausbilden [68].

Wie Abb. 1.5 zu entnehmen ist, weist Sam68 sieben PxxP-Motive auf, die mit P0 bis P6 bezeichnet werden. P0 ist vom Typ II, P4 und P6 vom Typ I; P3 und P5 weisen besonders viele Proline auf, während P1 und P2 lediglich aus dem Kern-PxxP-Motiv bestehen (vgl. Tab. 3.2). In der Literatur wurden bereits einige SH3-Domänen als Liganden beschrieben (siehe Tab. 1.4), darunter viele Vertreter der Src-Kinase-Familie. Neben den SH3-Domänen binden auch die WW-Domänen der Proteine FBP21 und FBP30 an einige Sam68-PxxP-Motive [69].

**Tabelle 1.4 Proteine, die über SH3-Domänen mit Sam68 interagieren**

Protein		Bindung an	Referenzen
Src-Kinasen	Brk/Sik	P3	[64], [70]
	Fgr		[71]
	Fyn	P3	[53], [52], [72], [73], [69], [74], [75], [76]
	Lck	P0	[77], [74], [78]
	Lyn		[72]
	Src	P0, P1, P3, P4, P5	[75], [53], [79], [72], [74]; [71], [80]
	Yes	P3	[75]
Andere	Btk		[81]
	Crk		[79]
	Grap		[82]
	Grb2	P0, P3	[82], [74], [76], [83], [80]
	Itk	P3, P4	[84], [74]
	Nck1 #1		[85]
	p47phox		[71]
	PI3K-p85 $\alpha$	P0, P3, P4	[79], [75], [71], [80]
	PLC $\gamma$ 1	P3, P4	[73], [75], [69], [71], [80]
	PRMT2		[75]
	Vav		[86]

Die Tyrosin-reiche Sequenz von Sam68 (YY in Abb. 1.5) weist 13 Tyrosine in einem Abschnitt von 46 Aminosäuren auf, die potentiell phosphoryliert werden können, u. a. von Src, Fyn und Brk [53,64,87]. An die Phosphotyrosine können dann über SH2-Domänen weitere Proteine, wie z. B. die Src-Kinasen [52], binden. Es liegt daher nahe zu vermuten,

dass Sam68 als Adapterprotein bei der Signaltransduktion fungiert [88]. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Sam68 nach Stimulierung verschiedener Rezeptoren an Tyrosin-Resten phosphoryliert wird (s.u.).

Zahlreiche Berichte zeigen, dass Sam68 in grossem Umfang **posttranslationale Modifikationen** aufweist. Oben wurde bereits erwähnt, dass die Tyrosine im C-Terminus von SFKs phosphoryliert werden können. Daneben können auch Serin- und Threonin-Reste z. B. durch Cdc2 phosphoryliert werden [89], was die Funktion von Sam68 im Rahmen des alternativen Spleissens moduliert (s.u.) [90]. Die Arginine in den RG-reichen Sequenzen (siehe Abb. 1.5) werden durch Protein-Arginin-N-Methyltransferasen (PRMTs), insbesondere PRMT1, mono- und dimethyliert [69,91]. Die Arginin-Methylierung ist irreversibel und stellt vermutlich einen Reifungsprozess im Zusammenhang mit der Lokalisation von Sam68 dar [91]. Eine weitere Modifikation ist die Acetylierung von Lysin-Resten, u. a. durch die Acetyltransferase CBP [66]. BABIC *et al.* konnten zeigen, dass Sam68 an Lysin 96 sumoyliert werden kann, was seine Funktionen im Rahmen der Zellzyklusregulation moduliert (s. u.) [92].

Die **subzelluläre Lokalisation** von Sam68 wird kontrovers diskutiert. Aufgrund des C-terminalen Kernlokalisierungssignals (NLS, siehe Abb. 1.5) sollte Sam68 ausschliesslich im Zellkern lokalisiert sein [93]. Dennoch kann Sam68 auch im Cytoplasma vorliegen, wahrscheinlich mit niedriger Konzentration, so dass es schwer nachweisbar ist [94]. Wenn sich während der Zellteilung die Kernmembran auflöst, erlangt Sam68 ebenfalls Zugang zur gesamten Zelle, was auch eine Grundvoraussetzung für die Interaktion mit den Src-Kinasen ist, die über einen N-terminalen Fettsäure-Rest an der Innenseite der Cytoplasmamembran verankert sind (siehe 1.1). Die Absonderung von den Src-Kinasen über den NLS-abhängigen Transport in den Zellkern während der Interphase stellt eine interessante Regulationsmöglichkeit für Sam68-vermittelte Effekte dar [95]. CHEN *et al.* haben die Lokalisation von Sam68 intensiv untersucht [96]. Sie beobachteten in Immunfluoreszenzanalysen, dass Sam68 in Tumorzelllinien (z. B. HeLa) sehr häufig 2 - 5 distinkte Punkte im Nucleoplasma ausbildet, die sich von anderen subnukleären Strukturen unterscheiden und neben Sam68 auch RNA und die Sam68-homologen Proteine SLM-1 und SLM-2 beinhalten. Diese sog. »Sam68/SLM nuclear bodies« (SNBs) sind in immortalisierten Zelllinien (z. B. HEK293) seltener (ca. 5 % der Zellen) und treten bei Primärzellen fast nie auf. Untersuchungen zahlreicher Sam68-Mutanten ergaben, dass auch weitere Lokalisationsmuster auftreten (ausschliesslich in SNBs, SNB-artige Strukturen im Cytoplasma, assoziiert mit Mikrotubuli u.a.), die gewissermassen durch die Mutation "eingefrorene" Zustände dynamischer Lokalisationsänderungen von Sam68 während seiner zellulären Funktionen darstellen.

Neben Sam68 gibt es bei Säugern noch die beiden **homologen** *Sam68-like mammalian proteins* SLM-1 (systematisch KHDRBS2) und SLM-2 (systematisch KHDRBS3, auch als T-STAR oder Salp bezeichnet) [68]. Im Vergleich zu Sam68 fehlt ihnen der N-Terminus bis zur NK-Domäne mitsamt den Motiven P0 bis P3, ansonsten weisen sie aber eine hohe Sequenzhomologie auf, v. a. im Bereich der GSG-Domäne. SLM-1 besitzt fünf PxxP-Motive im C-terminalen Bereich, von denen drei den Motiven P3, P4 und P5 bei Sam68 entsprechen, SLM-2 lediglich ein solches Motiv, das dem P5 entspricht. Funktionell sind die Proteine nur wenig charakterisiert, wobei sie oft ähnliche Funktionen wie Sam68 übernehmen [97].

Die bisherigen Veröffentlichungen über **zelluläre Funktionen** von Sam68 liefern ein sehr heterogenes Gesamtbild. Die multifunktionelle Natur des Proteins spiegelt sich in der oben dargestellten Vielfalt an Protein-Protein-Interaktionen, posttranslationalen Modifikationen, RNA-Bindungseigenschaften und dynamischen Lokalisationsänderungen wider, welche die molekulare Basis für die im Folgenden beschriebenen Funktionen bilden.

Wie bereits erwähnt, ist Sam68 in eine Reihe von **Signaltransduktionswegen** involviert. So konnte gezeigt werden, dass Sam68 nach Stimulierung des Insulin-, Leptin-, EGF-, T-Zell- oder FcγII-Rezeptors Tyrosin-phosphoryliert wird, was zu einer Assoziation mit *Downstream*-Signalmolekülen, wie der regulatorischen p85 $\alpha$ -Untereinheit der PI3-Kinase, der Phospholipase C $\gamma$  oder des Ras-GAP und deren Aktivierung führt [98-102]. Sam68 wird in diesem Zusammenhang als Adapterprotein angesehen. Die Phosphorylierung hat darüber hinaus zur Folge, dass die RNA-Bindungsfähigkeit von Sam68 abnimmt, was auch direkte Auswirkungen auf die Genexpression haben kann [103].

Wie der Name bereits andeutet, nimmt Sam68 auch Funktionen im Rahmen der **Zellzyklus-Regulation** wahr, weshalb es auch Implikationen im Rahmen von Entwicklungsprozessen und der Tumorentstehung gibt. Die Beteiligung von Sam68 an der Mitose beruht auf mehreren Einzelbefunden, die teilweise widersprüchlich sind und kein klares Bild ergeben. Die N-terminale Phosphorylierung von Src durch den Cdc2/Cyclin B-Komplex trägt zu dessen Aktivierung während der Mitose bei. Src kann dann Sam68 phosphorylieren, welches erst nach Auflösung der Kernmembran ins Cytoplasma gelangt [54]. Inhibition von Src verhindert die Sam68-Phosphorylierung und verzögert die Beendigung der Mitose [104]. Ausserdem wird Sam68 ebenfalls direkt von Cdc2 an Threonin-Resten phosphoryliert [89]. Darüber hinaus wurde berichtet, dass Sam68 den G1/S-Übergang fördert [105]. Demgegenüber steht die Beobachtung, dass die Überexpression von Sam68 zu einem Zellzyklus-Block in G1 durch Herunterregulation von Cyclin D1 und E führt [106], was durch Sam68-Sumoylierung noch verstärkt wird [92]. Ebenfalls widersprüchlich sind die Befunde, dass eine Reduktion von Sam68 zu einer Verzögerung des G2/M-Übergangs [107] bzw. zu

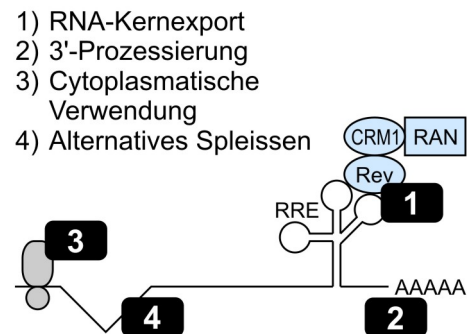
neoplastischer Transformation führt [108]. BUSÁ *et al.* konnten zeigen, dass die Sam68-Expression in 35 % der Prostata-Karzinom-Fälle hochreguliert ist, und die Sam68-Reduktion in einer entsprechenden Zelllinie wieder zu einer Zellzyklus-Verlangsamung führt [109]. Darüber hinaus wurde eine Mitwirkung von Sam68 bei der Entstehung von Brustkrebs [110] und MLL-Leukämie beschrieben [111]. Die Beteiligung von Sam68 an der Meiose wurde v. a. im Rahmen der Spermatogenese untersucht [112]. Männliche Sam68<sup>-/-</sup>-Knock-out-Mäuse sind vollständig infertil, weil die Spermatogenese gestört ist [113]. Sam68 bindet in Spermatozyten an einige mRNAs, die im Cytoplasma bis zum richtigen Translations-Zeitpunkt gelagert werden, weil vom kondensierten Chromatin keine *de-novo*-Transkription möglich ist. Der RNA-Protein-Komplex assoziiert mit Polysomen, wodurch die effiziente Translation gefördert wird [114]. Eine ähnliche Wirkung von Sam68 bei der Translation wurde auch in Neuronen beschrieben [94].

Eine Beteiligung von Sam68 am **RNA-Metabolismus** liegt nahe, weil das Protein eine RNA-Bindungsdomäne besitzt. Wie oben bereits erwähnt, bindet Sam68 direkt an zahlreiche RNAs und wurde mit Prozessen wie dem RNA-Kernexport (s. u.) und v. a. dem alternativen Spleissen in Verbindung gebracht. GROSSMAN *et al.* konnten bereits 1998 zeigen, dass Sam68 beim alternativen Spleissen verschiedener Reportersysteme beteiligt ist [115]. Dabei wird die Funktion von Sam68 durch extrazelluläre Signale reguliert, wie z. B. für das CD44-System gezeigt, bei dem die ERK-Aktivierung zur Sam68-Phosphorylierung führt, was den Einschluss des v5-Exons fördert [90]. Mit *bcl-x* ist ein weiteres Gen bekannt, dessen alternatives Spleissen von Sam68 beeinflusst wird. Überexpression von Sam68 fördert die Bildung der pro-apoptotischen Bcl-x(s)-Isoform, die Herunterregulation hingegen die Bildung der anti-apoptotischen Bcl-x(L)-Isoform. Tyrosin-Phosphorylierung von Sam68 durch Fyn kehrt den Effekt um [116]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Sam68 mit vielen Faktoren interagiert, die am Spleissen beteiligt sind, wie der Brm-Untereinheit des SWI/SNF-Komplexes [117], der p68 RNA-Helicase, SYNCRIP, hnRNP K [118] sowie SAFB1, SAFB2, hnRNP G [119] und U2AF [120].

Die Gruppe um S. RICHARD publizierte 2005 die Generierung einer **Sam68<sup>-/-</sup>-Knock-out-Maus** [121], deren Untersuchung sicherlich die besten Hinweise auf die Funktionen von Sam68 – zumindest im murinen – Organismus gibt. Es stellte sich heraus, dass Sam68 nicht essentiell für die Entwicklung ist, wenn auch viele Sam68<sup>-/-</sup>-Mäuse bei der Geburt starben. Die Weiterzucht von homozygot Sam68-defizienten Mäusen ist nicht möglich, da die Männchen wie oben beschrieben infertil sind und die Weibchen keinen Erfolg bei der Aufzucht haben. Die Charakterisierung des Knock-out-Phänotyps ergab, dass es bei älteren Mäusen zu Osteopetrose kommt, die den Alters-bedingten Knochenabbau verhindert. Die Ursache liegt in einer vermehrten Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks zu Osteoblasten anstatt zu Adipocyten. Interessant in diesem Zusammen-

hang ist, dass es bei Src-Knock-out-Mäusen ebenfalls, wenn auch zu einer viel stärker ausgeprägten und pathologischen Form der Osteopetrose kommt [122]. Neurologische Untersuchungen ergaben, dass der Sam68-Knock-out auch zu leichten Veränderungen bei der Motorik-Koordination führt [123].

Mehr als 20 Publikationen der letzten 10 Jahre belegen, dass Sam68 ein essentieller zellulärer Co-Faktor der **HIV-Replikation** ist, der eine massgebliche Rolle im viralen RNA-Metabolismus spielt. Auf molekularer Ebene wurden jedoch verschiedene Mechanismen für die Funktion von Sam68 beschrieben, die zwar teilweise umstritten sind, sich aber nicht notwendigerweise gegenseitig ausschliessen. Die Widersprüche dürften vor allem auf die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien und Reportersysteme für einzelne Prozesse zurückzuführen sein. In ihrer Gesamtheit lassen sich die Funktionen in vier Gruppen einteilen (vgl. Abb. 1.6):



**Abb. 1.6 Funktionen von Sam68 im Rahmen des HI-viralen RNA-Metabolismus**

- **RNA-Kernexport** – T.R. REDDY aus der Arbeitsgruppe um F. WONG-STAAAL beschrieb 1999, dass Sam68 in der Lage ist, Rev beim Kernexport RRE-haltiger RNAs funktionell zu ersetzen [124]. Darüber hinaus führte die Coexpression von Sam68 und Rev zu einer stark synergistischen Steigerung der Exportrate, während eine Sam68-Mutante ohne Kernlokalisierungssignal (Sam68 $\Delta$ C) dominant negativ wirkte. Die Steigerung der Proteinproduktion von einem CAT-Reportergen durch Sam68 im Zusammenspiel mit Rev bzw. die Hemmung durch Sam68 $\Delta$ C konnte analog auch für die Exportelemente anderer Retroviren, nämlich das HIV-2-RRE, das EIAV-RRE und das HTLV-RxRE beobachtet werden [125]. REDDY *et al.* führten den Effekt auf eine direkte Bindung von Sam68 an RRE zurück, wodurch die RNAs wahrscheinlich in einen CRM1-unabhängigen Exportweg dirigiert werden [124]. Weil auch die Expression eines *gagpol*-Reportergens mit dem konstitutiven Exportelement (CTE) von  $\delta$ -Retroviren gesteigert wurde, folgerten REDDY *et al.*, dass Sam68 generell in der Lage ist, RNAs in den Tap-Exportweg zu dirigieren [126]. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch eine Sam68-Variante mit nur einer Punktmutation in der NLS den dominant-negativen Effekt von Sam68 $\Delta$ C aufweist, der vermutlich durch das Zurückhalten von Rev im Cytoplasma verursacht wird [127]. Untersuchungen von SOROS *et al.* bestätigen den Sam68 $\Delta$ C-Effekt, für den zusätzlich der Sam68-Bereich 269-321 notwendig ist [128], widersprechen allerdings dem Mechanismus, dass Rev im Cytoplasma zurückgehalten wird, sondern zeigen vielmehr,

dass stattdessen endogenes Volllänge-Sam68 teilweise ins Cytoplasma relokalisiert wird [129]. Die Gruppe um J.J. HE konnte zeigen, dass die Überexpression von Sam68 in Astrocyten den in diesen Zellen gestörten Rev-abhängigen Export wiederherstellt, wohingegen sie die von REDDY beobachtete Stimulierung des Exports in anderen Zellen nicht reproduzieren konnten [130]. Auch COYLE *et al.* konnten weder den Einfluss von Sam68 auf den Export noch eine Bindung an das RRE bzw. CTE bestätigen [131].

Trotz der Widersprüche wird die entscheidende Bedeutung von Sam68 beim Rev/RRE-Export durch zwei unabhängige Knock-down-Studien mittels stabil exprimierter shRNAs [132] bzw. einer Sam68-*antisense*-RNA [133] belegt. Die letztere Studie schlägt dazu ein Modell vor, gemäss dem Sam68 den RNP-Komplex aus Rev-RRE-CRM1-Ran zur Kernpore dirigiert, was jedoch den frühen Befunden von REDDY entgegensteht, wonach Sam68 die RNAs in einen CRM-1-unabhängigen Weg schleust [134].

- **3'-Prozessierung** – Die Arbeitsgruppe um A. COCHRANE zeigte mit Hilfe eines *env*-Reportersystems, dass Sam68 die 3'-Prozessierung (Spaltung und Polyadenylierung) ungespleissster RNAs steigert, möglicherweise indem es die Prozessierungsmaschinerie zur Spaltstelle rekrutiert. Dadurch werden die Effizienz des Exports und die Stabilität der RNA erhöht, was letztendlich zu einer Steigerung der Env-Proteinproduktion führt [135]. Die homologen Proteine SLM-1 und SLM-2 wirken analog [136]. Interessanterweise zeigte sich darüber hinaus, dass der zentrale Bereich von Sam68 aus NK- und KH-Domäne alleine ausreichend ist, um in HEK293T-Zellen die Env-Proteinproduktion, nicht jedoch die 3'-Prozessierung der mRNA zu steigern, was auf eine unabhängige weitere Funktion von Sam68 schliessen lässt [136].
- **Cytoplasmatische Verwendung** – COYLE *et al.* zeigten, dass Sam68 den Kernexport eines Intron-haltigen GagPol-Reporters nur marginal, die Translationseffizienz hingegen sehr stark steigert [131]. Da Sam68 nicht ins Cytoplasma gelangt, postulierten sie, dass Sam68 durch Modulation des RNP-Komplexes vor dem Export die spätere cytoplasmatische Verwendung beeinflusst, indem es eine "Markierung" auf der RNA hinterlässt. Diese könnte in der veränderten 3'-Prozessierung bestehen (s. o., [135]). Entsprechend konnten MARSH *et al.* zeigen, dass die Sam68 $\Delta$ C-Mutante die Assoziation der RNAs mit Ribosomen und damit die Translationseffizienz hemmt, was auf eine Abnahme der Bindung von PABP1 zurückzuführen sein dürfte [137]. Diesen Ergebnissen zufolge ist die Sequestrierung der exportierten RNAs in perinukleäre Granula durch die Sam68 $\Delta$ C-Mutante, die ursprünglich von SOROS *et al.* für die Hemmung der Translation verantwortlich gemacht wurde [129], nicht hinreichend. Die Gruppe um J. J. HE konnte zeigen, dass es sich bei den von SOROS beobachteten perinukleären Strukturen um Stress-Granula handelt, die nicht nur durch Expression von Sam68 $\Delta$ C, sondern auch durch oxidativen Stress induziert werden, wobei auch ein Teil des Wildtyp-Sam68 dorthin

relokalisiert wird [138]. Darüber hinaus wird durch Bindung von Sam68 $\Delta$ C an eine spezielle Sekundärstruktur im 3'-UTR der *nef*-RNA spezifisch die Translation von Nef gehemmt [139].

- **Alternatives Spleissen** – Ein direkter Einfluss von Sam68 auf die komplexen alternativen Spleissvorgänge von HIV, bei denen mehr als 40 verschiedene RNA-Spezies entstehen, wurde zwar bislang nicht gezeigt, ist aber dennoch wahrscheinlich. Wie oben dargestellt wurde eine entsprechende Funktion für mehrere alternativ gespleisste zelluläre mRNAs beschrieben.

Abschliessend sei erwähnt, dass weitere Faktoren entdeckt wurden, die mit Sam68 interagieren und so dessen oben dargestellte Funktionen modulieren, etwa hnRNP K [140], das Hitzeschockprotein Hsp22 [141] oder das anti-apoptotische Protein Hax-1 [142].

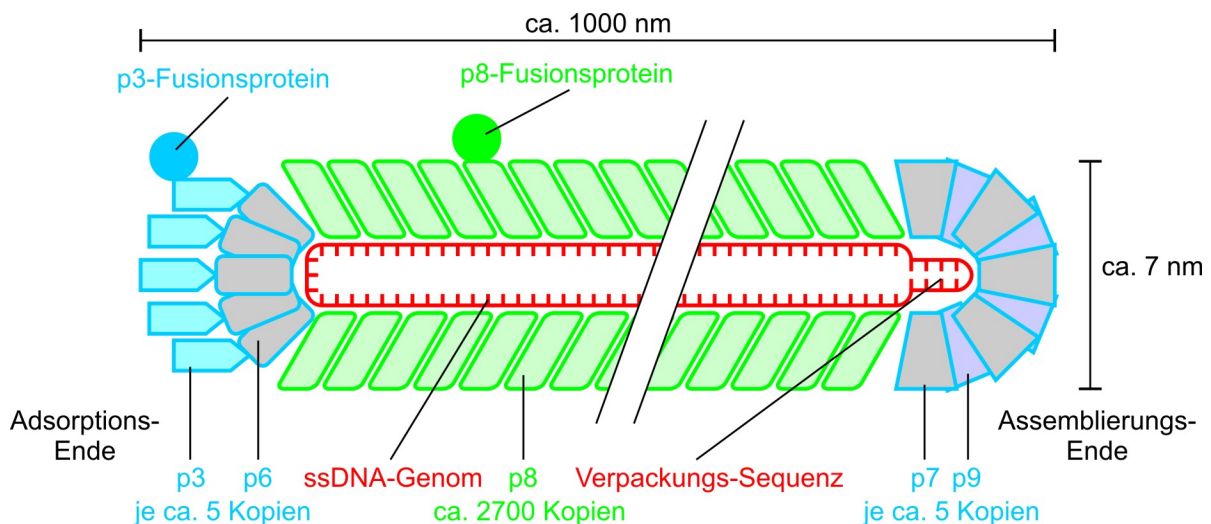
---

## 1.4 Phagen-Display

Die Identifizierung neuer Protein-Protein-Wechselwirkungen erfordert Techniken, die es erlauben, eine grosse Anzahl potentieller Bindungspartner für ein gegebenes Protein durchzumustern. Neben dem bekannten *yeast-2-hybrid*-System [143] ist insbesondere das im Folgenden detailliert behandelte Phagen-Display von Bedeutung, weil es mit geringem zeitlichen und materiellen Aufwand die effiziente Selektion und Identifizierung neuer Bindungspartner erlaubt. Daneben existieren weitere *in vitro*-Verfahren, wie das Ribosomen-Display [144] oder das verwandte mRNA-Display [145] (zur Übersicht siehe [146]).

Bakteriophagen (im Folgenden kurz »Phagen«) sind Viren, die Bakterienzellen infizieren, um deren biosynthetische Maschinerie zur Produktion von Nachkommenviren auszunutzen.

Der **filamentöse Bakteriophage M13** gehört zur Familie der Inoviridae [147]. Er wurde erstmals 1963 von P. HOFSCHEIDER aus Münchner Abwässern isoliert [148]. Die Viruspartikel haben eine stäbchenförmige Morphologie mit einem Durchmesser von ca. 7 nm, während die Länge von der Grösse des Genoms abhängt, wobei sie beim Wildtyp M13-Phagen mit 6407 Nucleotiden ca. 1  $\mu$ m beträgt. Das einzelsträngige DNA-Genom wird vom Haupt-Oberflächenprotein p8 helixförmig mit 1 Protein pro 2,3 Nucleotiden, also ca. 2700 Kopien, komplexiert [149]. Am Adsorptionsende des Phagen befinden sich je fünf Kopien der Strukturproteine p3 und p6, am Assemblierungsende je fünf Kopien von p7 und p9 (siehe Abb. 1.7). Ein Partikel hat ein Molekulargewicht von ca. 16 MDa.



**Abb. 1.7 Schematischer Aufbau eines M13-Phagen**

Das stäbchenförmige Virus besteht aus einem zirkulären ssDNA-Genom (rot), das vom Hauptoberflächenprotein p8 komplexiert wird (grün). Die Enden werden von den Strukturproteinen p3, p6, p7 und p9 gebildet. Beim Phagen-Display wird ein heterologer Proteinanteil mit p3 oder p8 fusioniert.

Der **M13-Lebenszyklus** beginnt mit dem Andocken des Phagenproteins p3 an die F-Pili Gram-positiver Enterobakterien wie *E. coli*. Durch die Interaktion von p3 mit dem bakteriellen Membrankomplex TolQRA kommt es zur Translokation des Phagen-Genoms ins Cytoplasma [150], welches von bakteriellen Polymerasen zu zirkulärer dsDNA, der sogenannten replikativen Form (RF), ergänzt wird [151]. Die Replikation beginnt mit der Spaltung des (+)-Strangs der DNA am Replikationsursprung f1 durch die virale Endonuclease p2. Während das Genom dann nach einem *rolling-circle*-Mechanismus vervielfältigt wird, wird die entstehende ssDNA von p5 komplexiert [152]. Die Assemblierung beginnt unter Beteiligung von p1 und p11 an der Membran. Ebenfalls beteiligt sind die Strukturproteine p7 und p9, die das Verpackungssignal der DNA binden. Im Folgenden werden die p5-Untereinheiten durch p8 ersetzt, während der wachsende Partikel durch eine Pore, die vom viralen Protein p4 gebildet wird, in den extrazellulären Raum transloziert wird. Abschliessend werden die Proteine p3 und p6 angefügt [152]. Die Replikation der Inoviridae führt nicht zur Lyse der Bakterien, allerdings wird deren Wachstumsgeschwindigkeit reduziert [153].

Das Prinzip des **Phagen-Displays** beruht auf der Tatsache, dass man fremde Peptide mit den Strukturproteinen der Phagen fusionieren kann, so dass der heterologe Protein-Anteil auf der Oberfläche des Phagen-Partikels präsentiert wird, während gleichzeitig die genetische Information für das Fusionsprotein im Phagen-Genom codiert ist [154]. Es liegt also eine Kopplung von Phänotyp und Genotyp vor, die man im sog. Bio-Panning-Verfahren (s. u.) ausnutzt, um aus einer ganzen Bibliothek von Phagen mit unterschiedlichen Fusionsproteinen diejenigen zu selektionieren, die mit höchster Affinität an eine gegebene Ziel-



struktur binden, und sie anschliessend durch Analyse des Genoms zu identifizieren (zur Übersicht siehe [155]).

Zur Konstruktion einer **Phagen-Bibliothek** benötigt man ein Gemisch von Phagmiden. Dabei handelt es sich um Plasmide, die neben einem gewöhnlichen Plasmid-Origin und einer Antibiotika-Resistenz als Selektionsmarker zusätzlich den ca. 500 bp grossen f1-Origin von M13 enthalten, der alle *cis*-regulatorischen Sequenzen (Replikationsstartpunkt, Verpackungssignal) beinhaltet. Das Phagmid codiert darüber hinaus für ein Oberflächenprotein des Phagen, an welches *in frame* die Gen-Varianten des heterologen Peptidanteils angehängt werden. Nach Einbringen der Phagmide in Bakterien infiziert man die Kultur mit einem Helferphagen (typischerweise der Stamm M13KO7). Dieser unterscheidet sich vom Wildtyp-Phagen nur durch eine Veränderung am Replikationsstartpunkt und eine korrespondierende Mutation in der Endonuclease p2, wodurch die Replikation des Phagmids (mit Wildtyp-Replikationsstartpunkt) etwa 20-mal effizienter ist, als die des Helferphagen-genoms [156]. Die Bakterienzellen produzieren also Phagenpartikel, in denen überwiegend das Phagmid verpackt ist, und deren Oberfläche ein Mosaik des Wildtypproteins und des Fusionsproteins ist. Für die Fusion wählt man je nach Fragestellung entweder das Hauptoberflächenprotein p8, wodurch viele Kopien auf dem Phagen präsentiert werden (polyvalentes Display), oder das Protein p3, wodurch nur 1 bis maximal 5 Kopien präsentiert werden (monovalentes Display).

Im **Bio-Panning-Verfahren** (Affinitätsselektion) inkubiert man diese Phagen-Bibliothek mit einem potentiellen Interaktionspartner, der an einer festen Matrix immobilisiert ist, entfernt anschliessend ungebundene Phagen durch gründliches Waschen und isoliert abschliessend gebundene Phagen, um mit ihnen wiederum Bakterien zu infizieren (siehe auch Schema in Abb. 3.2). Aus diesen lässt sich das Phagmid präparieren und sequenzieren, wodurch auf die Identität des bindenden Fusionsproteins geschlossen wird. Ausserdem lässt sich durch erneute Überinfektion mit einem Helferphagen eine weitere Bibliothek herstellen, in welcher die Binder angereichert sind und die für eine weitere Runde des Bio-Pannings eingesetzt werden kann. So lassen sich ggf. über mehrere Runden aus einer Bibliothek mit einer grossen Zahl von Varianten ( $10^{10}$  und mehr) ganz gezielt spezifische Binder für eine gewünschte Zielstruktur isolieren.

In der Praxis wird das Verfahren v. a. zur Analyse von Protein-Interaktionen, zur molekularen Evolution (z. B. Affinitätsreifungen) und zur Herstellung rekombinanter Antikörper eingesetzt [155].

## 1.5 Zielsetzung

---

Das zelluläre Protein Sam68 nimmt eine essentielle Rolle im Rahmen des RNA-Metabolismus während der HIV-Replikation ein. Weil Sam68 als STAR-Protein neben seinen RNA-modulierenden Eigenschaften auch die Fähigkeit zur Bindung zahlreicher Signaltransduktionsproteine hat, besteht die Möglichkeit, dass die Funktion von Sam68 während der viralen Replikation durch Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen den Interaktionen der PxxP-Motive von Sam68 mit SH3-Domänen anderer Proteine und seiner Wirkung auf die HIV-Replikation besteht.

Dazu sollten zunächst mit Hilfe eines Phagen-Display-Verfahrens bekannte Sam68-bindende SH3-Domänen verifiziert und ggf. neue Bindungspartner identifiziert werden. Auf Basis einer detaillierten Analyse der beteiligten Bindestellen in Sam68 sollten sodann Sam68-Mutanten hergestellt werden, die nicht mehr mit SH3-Domänen interagieren können. Abschliessend sollten diese Mutanten hinsichtlich eines Einflusses auf die HIV-Replikation untersucht werden. Darüber hinaus sollte ausgehend von den SH3-Domänen eine Strategie entwickelt werden, die als Basis einer HIV-Gentherapie das zelluläre Protein Sam68 funktionell während der HIV-Replikation inhibiert.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1 Molekularbiologie

---

Die **Klonierung** sämtlicher DNA-Konstrukte erfolgte unter Anwendung üblicher molekularbiologischer Techniken [157]. Eine detaillierte Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten und erzeugten Konstrukte findet sich in Anhang 5.2.

Das **Vektor**-Rückgrat wurde durch Verdau des Ausgangsplasmids mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen gemäss den Herstellerangaben erzeugt, die gewünschte Bande aus einem Agarosegel extrahiert und abschliessend mit CIP dephosphoryliert.

**Inserts** wurden auf eine der folgenden drei Arten hergestellt: 1) Direkte Gewinnung aus einem Ausgangsplasmid durch Restriktionsverdau und anschliessende Gelextraktion. 2) Generierung durch präparative PCR mit der *proof-reading* Polymerase DeepVent laut Herstellerangaben. Zur Amplifikation von auf Sam68 basierenden *templates* musste den Ansätzen 10 % (v/v) DMSO zugefügt werden. Durch Verwendung entsprechender Oligonucleotide wurden ggf. Schnittstellen angefügt, Mutationen eingeführt bzw. DNA-Fragmente nach dem Schema einer Fusions-PCR miteinander verbunden [158]. PCR-Produkte wurden anschliessend mit geeigneten Restriktionsendonucleasen verdaut. 3) Direktes *annealing* komplementärer synthetischer Oligonucleotide gefolgt von einer Phosphorylierung der 5'-Enden mit T4-PNK.

Die **Ligation** des Vektors mit einem dreifachen molaren Überschuss des Inserts wurde mit dem QuickLigation-Kit durchgeführt. Der gesamte Ligationsansatz wurde dann zur **Transformation** chemisch kompetenter (RbCl-Methode nach [159]) *E. coli* DH5 $\alpha$  bzw. bei Verwendung von pQE-Vektoren direkt zur Transformation des Expressionsstammes *E. coli* M15[pREP4] eingesetzt.

Nach Anzucht transformierter Bakterien in LB-Medium wurde eine **Plasmid-Isolierung** nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, gefolgt von einer Isopropanol-Fällung, durchgeführt [160]. Die Plasmide wurden durch geeignete Kontrollverdaue analysiert und schliesslich die Richtigkeit durch **Sequenzierung** bestätigt.

pGEX-Vektoren wurden zur Protein-Produktion in den Stamm *E. coli* BL21(DE3) eingebracht.

Grössere Mengen DNA für Transfektionen wurden mit den Qiagen Plasmid Midi- und Maxi-Kits isoliert, wobei die per UV-Absorption als  $A_{260} : A_{280}$ -Verhältnis bestimmte Reinheit stets im Bereich von 1,8 - 2,0 lag.

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
CIP	Roche, Nr. 713 023
Gelextraktion	Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit
DeepVent	New England Biolabs, M0258
T4-PNK	New England Biolabs, M0201
QuickLigation-Kit	New England Biolabs, M2200

*E. coli* DH5 $\alpha$  *supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96*  
*thi-1* *relA1*  
*E. coli* M15[pREP4] *Nal<sup>S</sup>* *Str<sup>S</sup>* *Rif<sup>S</sup>* *Thi<sup>-</sup>* *Lac<sup>-</sup>* *Ara<sup>+</sup>* *Gal<sup>+</sup>* *Mtl<sup>-</sup>* *F<sup>-</sup>* *RecA<sup>+</sup>* *Uvr<sup>+</sup>* *Lon<sup>+</sup>*  
Qiagen, Nr. 34210  
*E. coli* BL21(DE3) *hsdS* *gal* ( $\lambda$ clts857) *ind1* *Sam7* *nin5* *lacUV5-T7* gene 1  
LB-Medium 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,4

## 2.2 Phagen-Display

Die Vermehrung von Bakteriophagen erfolgte im Bakterien-Stamm *E. coli* TG1. Dieser trägt ein F-Plasmid, welches für die zur Infektion durch M13-Phagen notwendigen F-Pili codiert. Das F-Plasmid ist äusserst stabil, so dass kein permanenter Selektionsdruck zu seiner Erhaltung erforderlich ist. Eine Selektion ist über den auf dem F-Plasmid liegenden Auxotrophie-Marker *proAB* möglich, der zur Synthese der Aminosäure Prolin nötig ist. Die Selektion erfolgte durch Kultivierung von Vorkulturen in M9-MM (M9-Minimalmedium) bzw. auf M9-MM-Platten.

*E. coli* TG1 *supE* *hsd* $\Delta$ 5 *thi*  $\Delta$ (*lac-proAB*) F' [*traD36* *proAB<sup>+</sup>* *lacI<sup>f</sup>* *lacZ*  $\Delta$ M15]  
M9-MM 1x M9-Salze (1,28 % (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,3 % (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
0,05 % (w/v) NaCl, 0,1 % (w/v) NH<sub>4</sub>Cl), 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>,  
0,01 % (w/v) Thiamin, 0,4 % (w/v) Glucose  
ggf. 1,5 % Agar bei Platten

### 2.2.1 Produktion von Phagen-Überständen

Zur Produktion von Phagen-Überständen wurden 10 ml YT-AG-Medium mit TG1-Bakterien angeimpft, die mit dem gewünschten Phagmid transformiert und auf M9-MM-Platten kultiviert waren. Die Kultur wurde bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 geschüttelt. Die Infektion mit dem Helferphagen erfolgte nach Zugabe von 1·10<sup>10</sup> cfu M13KO7 bei 37°C für 30 min. Um das Medium zur Selektion auf Phagmid und Helferphage zu wechseln, wurden die Bakterien zunächst gewaschen (Zentrifugation bei 5500·g, 10 min, RT, Resuspendierung des Pellets in 5 ml YT-AK), pelletiert (5500·g, 10 min, RT) und in 15 ml YT-AK aufgenommen. Die Produktion der Phagen erfolgte bei 30°C und 220 rpm ÜN bei Einzelüberständen bzw. begrenzt auf nur 5 h bei Mischungen (SH3-Bibliothek, Elutionen beim Bio-Panning (siehe 2.2.3)) um zu verhindern, dass einzelne Phagen aufgrund eines Produktionsvorteils überproportional häufig vertreten sind. Zur Gewinnung des reinen Phagen-Überstands wurden die Bakterien durch Zentrifugation (5500·g, 10 min, RT) und anschliessende Filtration des Mediums durch einen 0,45 µm-Filter entfernt.

M13KO7 Helfer-Phage, GE Healthcare, 27-1524-01  
YT 2x YT-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
1 % (w/v) NaCl, pH 7,0  
YT-AG 2x YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose  
YT-AK 2x YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Kanamycin

### **2.2.2 Titration**

Da es sich bei M13 um einen nicht lysogenen Phagen handelt und der Transfer des Phagmids bei der Infektion zum Erwerb einer Ampicillin-Resistenz führt, wachsen infizierte Bakterien auf LB-Amp-Platten zu Kolonien heran. Der infektiöse Titer von M13-Phagen-Überständen wird daher als »Kolonie-bildende Einheiten pro ml« (*colony forming units / ml* = **cfu / ml**) angegeben.

Zur Titer-Bestimmung wurden zunächst *E. coli* TG1-Zellen vorbereitet: 50 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie von einer M9-MM-Platte angeimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 geschüttelt. Die Zellen wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert und waren bis zu drei Tage lang haltbar, wobei jedoch die Transduktionseffizienz im Laufe der Zeit abnahm. Daher wurde zur Normierung bei jeder Titerbestimmung stets ein Referenzphage (willkürlich gewählter Phagen-Überstand mit der Bezeichnung »p6-9«, Titer eingestellt auf  $1 \cdot 10^{12}$  cfu/ml) mitgeführt.

Die zu titrierenden Phagen-Überstände wurden seriell in LB-Medium verdünnt (typische Verdünnungen  $1 : 10^5$  bis  $1 : 10^7$ ) und je 4 µl davon zu 200 µl TG1-Zellen gegeben, die zuvor für 10 min bei 37°C inkubiert worden waren. Die Infektion erfolgte für 30 min bei 30°C. Anschliessend wurden je 50 µl der Bakterienkultur auf SOBAG-Platten ausplattiert und ÜN bei 30°C bebrütet. Der Titer errechnet sich wie folgt:

$$\text{Titer / cfu/ml} = \text{Anzahl der Kolonien} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 1000 \quad (2.1)$$

Die Normierung erfolgt gemäss:

$$\text{Normierter Titer} = \frac{\text{Titer(Phagen - Überstand X)}}{\text{Titer(Phagen - Überstand p6 - 9)}} \cdot 10^{12} \quad (2.2)$$

Die Titerbestimmung wurde stets in Triplikaten durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Die Standardabweichung betrug i. d. R. 5 - 15 %; bei grösseren Abweichungen wurde die Titration wiederholt.

SOBAG-Platten 2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl,  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Glucose, 100 µg/ml Ampicillin,  
1,5 % (w/v) Agar

### **2.2.3 Bio-Panning**

Die Bio-Panning-Prozedur diente der Identifizierung von SH3-Domänen, die an ein gewünschtes Zielprotein binden (siehe 3.1.4). Dazu wurde das rekombinant hergestellte Zielprotein an eine feste Trägermatrix (magnetische Dynabeads) gebunden und mit der SH3-Phagen-Bibliothek inkubiert. Nicht gebundene Phagen wurden durch intensives Waschen entfernt, gebundene Phagen eluiert und zur Infektion von TG1-Zellen eingesetzt. Aus einigen der erhaltenen Kolonien wurden die Phagmide isoliert und die SH3-Domänen durch DNA-Sequenzierung identifiziert.

**Vorbereitung der Dynabeads:**

100 µl Dynabeads wurden zunächst dreimal gewaschen (im Magnetständer Überstand abnehmen, resuspendieren in 100 µl Bead-Puffer). Anschliessend wurden 10 µg des Zielproteins in 100 µl Bead-Puffer zugegeben, gevortext, 50 µl Ammoniumsulfatlösung zugegeben und der Ansatz ÜN bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde der Überstand verworfen, 100 µl Blocking-Puffer zugegeben und der Ansatz eine Stunde bei RT geschüttelt. Schliesslich wurden die Beads dreimal gewaschen (im Magnetständer Überstand abnehmen, resuspendieren in 1 ml PBS).

**Phagen-Selektion:**

100 µl der Phagen-Bibliothek oder eines Phagen-Überstands aus einer früheren Runde (Titer > 10<sup>9</sup> cfu/ml) wurden mit 100 µl Blocking-Puffer gemischt und 15 min bei RT geschüttelt. Von den vorbereiteten Beads wurde im Magnetständer der Puffer abgenommen. Dann wurden die 200 µl Phagen-Lösung zugegeben und der Ansatz 1 h bei RT geschüttelt. Die Überstände wurden im Magnetständer abgenommen und für eine Titerbestimmung aufbewahrt (ÜS-#1). Die Beads wurden zehnmal gewaschen (resuspendieren in 1 ml Waschpuffer, im Magnetständer Überstand abnehmen) und gebundene Phagen mittels eines pH-Sprungs eluiert (Zugabe von 100 µl Elutionspuffer, pH 2,2, schütteln bei RT, 10 min). Der Überstand mit den eluierten Phagen wurde im Magnetständer abgenommen und durch Zugabe von 30 µl 1 M Tris, pH 9, neutralisiert. 10 µl der Elutionsfraktion wurden für eine Titerbestimmung aufbewahrt (ÜS-#2). Die restlichen 120 µl wurden ggf. zur Herstellung eines Phagen-Überstands für eine Folgerunde eingesetzt. Hierzu wurden die Phagen vollständig zu 3 ml TG1-Zellen, wie sie auch zur Titration verwendet werden, gegeben. Nach einer Vorinkubation von 45 min bei 37°C und 220 rpm (während dieser Zeit wird das β-Lactamase-Gen für die Ampicillin-Resistenz exprimiert) wurden 7 ml YT-AG zugegeben und die Kultur für weitere 20 min inkubiert. Nun wurde der Helferphage zugegeben und ab hier verfahren, wie es bei der Produktion von Phagen-Überständen beschrieben ist (siehe 2.2.1, ÜS-#3). Abschliessend wurde eine Titration durchgeführt.

**Analyse:**

Zur quantitativen Betrachtung der Phagenanreicherung wurden die 3 Phagen-Überstände (ÜS-#1, -#2 und -#3) titriert (siehe 2.2.2). Zur Identifizierung der SH3-Binder wurden aus einer entsprechenden Anzahl von Kolonien der SOBAG-Platten aus der Titration der Elutionsfraktion (ÜS-#2) die Phagmide isoliert und der Bereich des *sh3*-Gens sequenziert (siehe 2.1). Die automatisierte Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem eigens hierzu erstellen Programm »SH3-Seq« (siehe 5.4).

Dynabeads	M-270 Epoxy, Invitrogen 143-02D Eingestellt auf $1 \cdot 10^9$ Beads / ml in DMSO
Bead-Puffer	0,1 M Na-Phosphat, pH 7,4
Ammoniumsulfat-Lösung	3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7,4
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,47 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4
Waschpuffer	PBS mit 0,5 % (v/v) Tween-20
Blocking-Puffer	5 % BSA in Waschpuffer
Elutionspuffer	200 mM Glycin, pH 2,2

### 2.2.4 Phagen-ELISA

Der Phagen-ELISA erlaubt die relative Quantifizierung der Affinität von SH3-Phagen zu einem Zielprotein.

Zum Coaten der ELISA-Platte wurden 100 µl einer Lösung des Zielproteins (10 µg/ml in Coating-Puffer) in jedes Well gegeben und die Platte ÜN bei 4°C inkubiert.

Der ELISA wurde dann nach folgendem Schema durchgeführt:

- Waschen: Washer, Programm »p24\_3x\_A«
- Blockieren: Zugabe von je 200 µl Blocking-Puffer pro Well, 1 h bei RT
- Waschen: Washer, Programm »p24\_3x\_A«
- Inkubation mit den zu untersuchenden Phagen-Überständen: 1 h bei RT  
Zugabe von seriellen Verdünnungen der Überstände, je 100 µl pro Well  
Je nach Versuch 1 : 2 bis 1 : 5 in LB-Medium
- Waschen: Washer, Programm »p24\_10\_A«
- Detektion: Zugabe von je 100 µl AK-Lösung pro Well, 1 h bei RT
- Waschen: Washer, Programm »p24\_20\_A«
- Entwickeln: Zugabe von je 100 µl TMB-Substratlösung pro Well, 90 s bei RT
- Stoppen: Zugabe von je 50 µl 1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pro Well
- Messung der Absorption bei 450 nm

Für quantitative Auswertungen wurde der Phagen-ELISA je 3x durchgeführt und die erhaltenen Absorptionswerte gemittelt; die Standardabweichung lag i. d. R. bei ca. 2 - 5 %. Die Auswertung erfolgte nach dem Modell für eine Protein-Protein-Interaktion in Analogie zur MICHAELIS-MENTEN-Kinetik: Die Auftragung der Absorption gegen den Titer in cfu/ml ergibt eine typische Sättigungskurve bzw. bei halblogarithmischer Auftragung eine sigmoide Kurve. Zur Abschätzung der Dissoziationskonstanten wurden die Werte wie folgt transformiert (Auftragung nach SCATCHARD):

$$\frac{\text{OD}}{c(\text{SH3})} = -\frac{1}{K_d} \cdot \text{OD} + x \quad (2.3)$$

Man erhält also eine Gerade, aus deren Steigung sich der  $K_d$ -Wert ergibt. Weil die Konzentration der SH3-Domänen unbekannt ist, wurde ausgehend von einer Interaktion mit bekanntem  $K_d$ -Wert (Nef-Hck-Interaktion, siehe 3.1.5) ein Korrekturfaktor berechnet, der die Umrechnung von der bekannten Phagen-Konzentration auf die SH3-Domänen-Konzentration erlaubt.

ELISA-Platte	Maxisorp, Nunc 442404
Coating-Puffer	100 mM Natrium-Carbonat, pH 9,5
Blocking-Puffer	PBS mit 5 % (w/v) BSA
Washer	Tecan Hydroflex, HydroControl-Software Version 1.0.1.0
	Waschpuffer (WP) stets PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20
	Programme:
	Absaugen
	Dispensieren: 300 µl WP pro Well, 300 µl/s
	Kontinuierliches Waschen/Saugen mit (400 µl/s):
	1 ml WP bei Programm »p24_3x_A«
	2 ml WP bei Programm »p24_6x_A«
	3 ml WP bei Programm »p24_10x_A«
	2x 3 ml WP bei Programm »p24_20x_A«
	Endabsaugung
AK-Lösung	α-M13-HRP-gekoppelter Antikörper, GE Healthcare, 27-9421-01
	1 : 5000 in Blocking-Puffer
TMB-Substratlösung	20 Vol. Lösung A + 1 Vol. Lösung B vor Gebrauch mischen
	Lösung A: 30 mM Kalium-Citrat, pH 4,2
	Lösung B: 10 mM TMB, 10 % (v/v) Aceton, 90 % (v/v) Ethanol,
	80 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## 2.3 Proteinbiochemie

### 2.3.1 Protein-Expression in *E. coli*

Die Produktion von GST-Fusionsproteinen erfolgte mit dem pGEX-Vektorsystem (GE Healthcare) im Bakterienstamm BL21(DE3), die von His-Fusionsproteinen mit dem pQE-Vektorsystem (Qiagen) im Stamm M15[pREP4].

Ein geeignetes Kulturvolumen (siehe Tabelle 2.1) wurde aus einer ÜN-Kultur der jeweiligen Bakterien angeimpft und bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 geschüttelt. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und 220 rpm wurde die Kultur für 15 min bei 6000·g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet wie unter 2.3.2 bzw. 2.3.3 beschrieben weiterverarbeitet.

**Tabelle 2.1 Übersicht der Kulturvolumina zur Protein-Produktion**

Konstrukt (siehe 5.2.2)	Kulturvolumen	Medium	Tag
pQE-30-Sam68	800 ml	LB-Amp,Kan	His (RGSH <sub>6</sub> )
pQE-30-Nef	400 ml		
pGEX-KG	250 ml	LB-Amp	GST
pGEX-SH3-xxx			
pGEX-Px			
pGEX-Px-My	50 ml		

### 2.3.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Lyse wurde das Bakterienpellet (siehe 2.3.1) in 20 ml NETN resuspendiert, bei -20°C eingefroren, wieder aufgetaut, mit 400 µl Lysozym-Lösung versetzt, 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und Ultraschall-behandelt (Bandelin Sonoplus, 5 min,



Cycle 5, Intensität 60 %, auf Eis). Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20 000-g, 4°C, 1 h) abgetrennt.

Die Aufreinigung der GST-Fusionsproteine erfolgte affinitätschromatographisch mit Hilfe von Glutathion-Sepharose in einem kombinierten Batch- und Säulenverfahren. GSH-Sepharose (1 ml Bettvolumen bei 250 ml Ausgangskultur, 0,2 ml Bettvolumen bei 50 ml Ausgangskultur) wurde in eine Säule gefüllt, 3x mit je 5 ml NETN gewaschen und anschliessend zum Lysat gegeben. Nach Inkubation im Überkopfschüttler ÜN bei 4°C wurde die Suspension zentrifugiert (500-g, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die abgesetzte Affinitätsmatrix in eine Säule überführt. Zum Waschen des Materials wurden 3x je 5 ml NETN und 3x je 5 ml GST-Waschpuffer auf die Säule gegeben. Zur Elution wurde der Auslauf verschlossen, das Säulenmaterial in 1 Bettvolumen (1 bzw. 0,2 ml) GST-Elutionspuffer resuspendiert, 10 min bei RT inkubiert und das Eluat nach Öffnen der Säule aufgefangen. Insgesamt wurden auf diese Weise 3 Elutionen durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden abschliessend 2x gegen je 1,8 l PBS dialysiert und die Proteinkonzentrationen bestimmt (siehe 2.3.4).

Zur Dokumentation der Reinigung wurden bei allen Reinigungsschritten Aliquots entnommen und durch eine SDS-PAGE-Analyse mit Coomassie-Färbung analysiert (siehe 2.3.5).

NETN	20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 % (v/v) Nonidet P-40, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF
Lysozym-Lösung	50 mg/ml Lysozym in 10 mM Tris, pH 8,0
GSH-Sepharose	Glutathion-Sepharose 4B, GE Healthcare 17-0756
GST-Waschpuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
GST-Elutionspuffer	Waschpuffer mit 20 mM GSH
Dialyseschlauch	Roth, Spectra/Por 4, Grössenausschluss 12 - 14 kDa

### **2.3.3 Aufreinigung von His-Fusionsproteinen**

Zur Lyse wurde das Bakterienpellet (siehe 2.3.1) in 20 ml Ni-Lysepuffer resuspendiert, mit 400 µl Lysozym-Lösung versetzt, 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert und Ultraschall-behandelt (Bandelin Sonoplus, 5 min, Cycle 5, Intensität 60 %, auf Eis). Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20 000-g, 4°C, 1 h) abgetrennt.

Die Aufreinigung der His-Fusionsproteine erfolgte affinitätschromatographisch mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose in einem kombinierten Batch- und Säulenverfahren. Ni-NTA-Agarose (1 ml Bettvolumen) wurde in eine Säule gefüllt, 3x mit je 5 ml Ni-Lysepuffer gewaschen und anschliessend zum Lysat gegeben. Nach Inkubation auf einem Überkopfschüttler für 1 h bei RT wurde die Suspension zentrifugiert (500-g, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die abgesetzte Affinitätsmatrix in eine Säule überführt. Gewaschen wurde 3x mit je 5 ml Ni-Lysepuffer und 3x mit je 5 ml Ni-Waschpuffer. Eluiert wurde 3x mit je 1 ml Ni-Elutionspuffer bei einer Flussrate von ca. 0,2 ml/min. Abschliessend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (siehe 2.3.4).

Zur Dokumentation der Reinigung wurden bei allen Reinigungsschritten Aliquots entnommen und durch eine SDS-PAGE-Analyse mit Coomassie-Färbung analysiert (siehe 2.3.5).

Ni-NTA-Agarose	Qiagen 30230
Ni-Lysepuffer	50 mM Na-Phosphat, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Ni-Waschpuffer	50 mM Na-Phosphat, pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Ni-Elutionspuffer	50 mM Na-Phosphat, pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol

### **2.3.4 Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem Bradford-Prinzip mit dem Bio-Rad Protein Assay im Mikrotiterformat. 160 µl Proteinlösung in PBS wurden mit 40 µl Reagenz gemischt, 5 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen. Der Assay ist linear im Bereich von 5 bis 25 µg/ml; ggf. wurden entsprechende Protein-Verdünnungen in PBS hergestellt. Als Standard diente stets eine BSA-Verdünnungsreihe (0, 5, 10, 15, 20, 25 µg/ml); der Korrelationskoeffizient  $R^2$  der Ausgleichsgeraden war stets  $> 0,98$ . Es wurden stets Dreifachbestimmungen durchgeführt; die Standardabweichung war  $< 5 \%$ .

Bio-Rad Protein Assay Bio-Rad 500-0006

### **2.3.5 SDS-PAGE**

SDS-PAGE-Analysen [161] wurden mit dem Mini-Gel-System von Biometra entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Je nach erwünschtem Auftrennungsbereich wurden 1 mm dicke Mini-Gele mit 10, 12,5 oder 15 % Acrylamid eingesetzt, als Standard diente stets der Broad-Marker. Proben wurden mit 1 Vol. 2x SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt, vor dem Auftragen 5 min auf 95°C erhitzt und 1 min bei 20 000-g und RT zentrifugiert.

Zur Coomassie-Färbung wurden die Gele nach dem Lauf direkt in Coomassie-Färbelösung überführt, 30 min geschüttelt und anschliessend mit Entfärbelösung ÜN entfärbt.

2x SDS-PAGE-Ladepuffer	125 mM Tris, 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 10 % (w/v) Glycerin, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Broad-Marker	Biorad Broad Range, 161-0137 Größen: 200, 116, 97, 66, 45, 31, 22, 14, 6,5 kDa
Coomassie-Färbelösung	0,125 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	7 % (v/v) Essigsäure

### **2.3.6 Western-Blot-Analyse**

Gele wurden nach der SDS-PAGE (siehe 2.3.5) für 15 min in Western-Transfer-Puffer äquilibriert. Blots erfolgten im Semi-Dry-Verfahren mit folgendem Aufbau:

Anode (unten) - 3x Whatman-Papier - Membran - Gel - 3x Whatman-Papier - Kathode (oben)

Der Transfer wurde bei 1,5 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h durchgeführt. Nach dem Blot wurde die Membran 1 min mit Ponceau S-Färbelösung gefärbt und mit Wasser soweit entfärbt, dass die Standard-Banden markiert werden konnten.

Die Western-Blot-Analyse wurde dann nach folgendem Schema durchgeführt:

- Blockieren: Zugabe von 50 ml Blocking-Puffer, ÜN schütteln bei 4°C
- Waschen: 3x mit je 25 ml TBS/T, 5 min schütteln bei RT
- Primär-Antikörper: 3 ml Antikörper-Lösung (siehe Tabelle 2.2), 1 h bei RT
- Waschen: 3x mit je 25 ml TBS/T, 5 min schütteln bei RT
- Sekundär-Antikörper: 5 ml Antikörper-Lösung (siehe Tabelle 2.2), 1 h bei RT
- Waschen: 3x mit je 25 ml TBS/T, 5 min schütteln bei RT
- Entwickeln: Zugabe von 1,5 ml Substrat-Lösung, 1 min bei RT
- Detektion: CCD-Kamera-Aufnahme, Intas Chemilux Pro, 10 min

**Tabelle 2.2 Übersicht der Western-Blot-Antikörper**

Primär-Antikörper			Sekundär-Antikörper		
Name	Hersteller, Bestell-Nr.	Verdünnung (in TBS)	Name	Hersteller, Bestell-Nr.	Verdünnung (in TBS)
$\alpha$ -Sam68 C-20	Santa Cruz, sc-333	1 : 5000	$\alpha$ -Rabbit-HRP	Pierce, 31460	1 : 5000
$\alpha$ -GFP	Clontech, 632460	1 : 500			
$\alpha$ -HA High Affinity 3F10	Roche, 1867423	1 : 5000	$\alpha$ -Rat-HRP	DAKO, P0450	1 : 5000
$\alpha$ -GAPDH-HRP	Sigma, G9295-25UL	1 : 20000	entfällt, da Primär-Antikörper HRP-gekoppelt ist		

Western-Transferpuffer 25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol  
 Membran Nitrocellulose (Protran), 0,45  $\mu$ m, Whatman 10401196  
 Ponceau S-Färbelösung 0,2 % Ponceau S in 1 % (v/v) Essigsäure  
 Blocking-Puffer 5 % Magermilchpulver in TBS  
 TBS 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4  
 TBS/T TBS mit 0,1 % (v/v) Tween-20  
 Substrat-Lösung SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce 34077

### **2.3.7 Pull-Down-Assay**

Mit dem Pull-Down-Assay wurde die Interaktion von rekombinant hergestellten GST-SH3-Proteinen mit endogenem Sam68 aus Zelllysaten (siehe 2.4.3) untersucht.

Epoxy-Dynabeads wurden wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben vorbereitet, wobei jedoch mit 50  $\mu$ g eine grössere Menge der GST-SH3-Zielproteine eingesetzt wurde. Geblockt wurde mit 500  $\mu$ l 5 % (w/v) BSA in PBS.

Anschliessend wurden 500  $\mu$ l des Zelllysats (5  $\mu$ g/ $\mu$ l  $\rightarrow$  2,5 mg Gesamtmenge) zugegeben und der Ansatz ÜN bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads wurden dann 3x mit je 1 ml PBS gewaschen und abschliessend zur Elution des gebundenen Sam68 in 25  $\mu$ l 2x SDS-PAGE-Ladepuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt.

Die Analyse erfolgte per SDS-PAGE (siehe 2.3.5) und Western-Blot-Analyse mit dem  $\alpha$ -Sam68-Antikörper (siehe 2.3.6).

**2.3.8 p24-ELISA**

Der p24-ELISA dient der Quantifizierung der Menge an HIV-Capsid-Protein (p24) in Zellkulturüberständen, das ein Mass für die Menge an produziertem Virus ist.

Nach Abtrennung von Zellen (Zentrifugation bei 300-g, 5 min, RT, Abnahme des Überstands) wurden die zu untersuchenden Zellkulturüberstände zur Inaktivierung und Lyse der HI-viralen Partikel mit 1/10 Volumen 5 % (v/v) Triton-X-100 in PBS versetzt, 1 h bei RT inkubiert und dann ggf. bis zum ELISA bei -20°C gelagert. Die Überstände wurden unverdünnt sowie in Verdünnungen von 1 : 10 und 1 : 100 in Vollmedium eingesetzt. Als Standard diente ein selbst hergestellter und inaktivierter Virus-Überstand, dessen Konzentration mit Hilfe eines diagnostischen Kits (»HIV-1 p24 Antigen Capture Assay«, Advanced BioScience Laboratories, Inc.) bestimmt wurde. Er wurde beginnend bei 2,5 ng/ml seriell 1 : 2 über 6 Stufen in Vollmedium verdünnt und analog zu den Proben behandelt.

Der ELISA wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Coaten: Zugabe von je 100 µl Capture-AK-Lösung pro Well, Inkubation ÜN bei 4°C
- Waschen: Washer, Programm »p24\_3x\_A«
- Capture: Zugabe von je 100 µl inaktiviertem Zellkulturüberstand, 1 h bei 37°C
- Waschen: Washer, Programm »p24\_6x\_A«
- Detektion: Zugabe von je 100 µl Sekundär-AK-Lösung pro Well, 1 h bei RT
- Waschen: Washer, Programm »p24\_10x\_A«
- Detektion: Zugabe von je 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung, 30 min bei RT
- Waschen: Washer, Programm »p24\_10x\_A«
- Entwickeln: Zugabe von je 100 µl TMB-Substratlösung pro Well, 1 min bei RT
- Stoppen: Zugabe von je 50 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Well
- Messung der Absorption bei 450 nm

Die Konzentrationen der Proben wurden durch Vergleich mit dem Standard (Auftragung der Absorption gegen die Konzentration, Ausgleichsgerade durch Punkte im linearen Bereich, i. d. R. Werte im Bereich von 1,3 ng/ml bis 0,08 ng/ml, Korrelationskoeffizient  $R^2$  der Geraden stets > 0,99) ermittelt.

Capture-AK-Lösung	M01-AK: Polymun AB006 1 : 1000 in Coating-Puffer
Blocking-Puffer	PBS mit 1 % (w/v) BSA
Sekundär-AK-Lösung	37G12-AK: Polymun AB005, biotinyliert 1 : 5000 in Blocking-Puffer
Streptavidin-HRP-Lösung	Streptavidin-HRP-Konjugat: Roche, 11089153001, 500 U/ml 1 : 10000 in Blocking-Puffer
Vollmedium	siehe 2.4.1
Sonstige Reagenzien, Waschprogramme	siehe 2.2.4

## 2.4 Zellbiologie

### 2.4.1 Zelllinien und Kultivierung

Eukaryotische Zellen wurden nach gängigen Methoden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Adhärenent wachsende HEK293T-Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz, ca. alle 2 - 3 Tage, 1 : 10 gesplittet (waschen mit PBS, ablösen mit Trypsin-EDTA-Lösung, resuspendieren in DMEM-Vollmedium). Die in Suspension wachsenden MT-4-Zellen wurden zum Splitten direkt in frischem RPMI-Vollmedium verdünnt, so dass die Zelldichte im Bereich von  $2 \cdot 10^5$  und  $1 \cdot 10^6$  Zellen / ml gehalten wurde.

HEK293T	Ad5-transformierte embryonale Nierenfibroblasten-Zelllinie ATCC-# CRL-11268
MT-4	Humane T-Zell Leukämie-Zelllinie <i>AIDS Research and Reference Reagent Program</i> , Nr. 120
FCS	Verschiedene Chargen von Gibco, Lonza, PAN Biotech Verwendete Chargen wurden zuvor auf gutes Zellwachstum getestet
Pen/Strep	10000 U/ml Pen., 10 mg/ml Strep., PAN Biotech P06-07100
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS, Pan Biotech P10-023500
DMEM-Vollmedium	DMEM (Invitrogen 41966) + 50 ml FCS, 5 ml Pen/Strep
RPMI-Vollmedium	RPMI 1640 (PAN Biotech P04-16500) + 50 ml FCS, 5 ml Pen/Strep

### 2.4.2 Transfektion

Zum Einbringen von DNA wurden HEK293T-Zellen mit der Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode [162] transfiziert.

Dazu wurden am Vortag  $1 \cdot 10^5$  Zellen in 2,5 ml DMEM-Vollmedium pro Well einer 6-Well-Platte (Falcon 35 3046) ausgesät. 1 h vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die jeweiligen DNA-Lösungen in einem Volumen von 270 µl wurden mit 30 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt und tröpfchenweise unter Vortexen zu 300 µl 2x HeBS in einem 5 ml-Röhrchen gegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde die Lösung auf die Zellen getropft und durch Schwenken gründlich gemischt. Nach 6 h wurde erneut das Medium gewechselt.

CaCl <sub>2</sub> -Lösung	2,5 M CaCl <sub>2</sub>
2x HeBS	50 mM HEPES, pH 7,05, 1,5 mM NaHPO <sub>4</sub> , 280 mM NaCl

### 2.4.3 Zelllysate

Lysate eukaryotischer Zellen wurden durch Verwendung eines Detergens-haltigen Puffers hergestellt. Die Mengenangaben im Folgenden beziehen sich jeweils auf ein Well einer 6-Well Platte bzw. eine 15 cm-Petrischale.

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 1 ml bzw. 10 ml PBS abgespült und 5 min bei 300·g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und der Ansatz erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 150 µl bzw. 500 µl eiskaltem TDLB (mit Proteaseinhibitoren zur Inaktivierung zellulärer Proteasen) resuspendiert. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert, wobei alle 5 min kräftig gevortext wurde. Falls das Lysat durch die freigesetzte DNA sehr viskos erschien, wurde der Ansatz

5 min im Bioruptor mit Ultraschall behandelt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20 000-g, 10 min, 4°C) abgetrennt. Abschliessend wurde die Proteinkonzentration des Überstands, der die löslichen Proteine enthält, bestimmt. Die Ausbeuten lagen i. d. R. bei ca. 0,5 mg (6-Wells, 48 h nach Transfektion) bzw. ca. 10 mg (fast konfluente 15 cm-Petrischalen).

TDLB	50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) SDS,
	1 % (v/v) Nonidet P-40, 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat
Proteaseinhibitoren	Complete Mini von Roche, 11836153001
	1 Tablette pro 10 ml TDLB direkt vor Gebrauch zusetzen
Bioruptor	Diagenode UCD-200, Einstellung "High" (320 W), 30 sec Puls/Pause

#### **2.4.4 FACS-Analyse**

Bei der Durchflusscytometrie werden Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom durch eine Kapillare geleitet und dabei vereinzelt, so dass eine Analyse auf Einzelzellbasis möglich ist. Dabei passieren sie eine Messkammer, in der sie mit Laser-Licht bestrahlt werden, dessen Streuung Informationen über Grösse und Granularität der Zellen liefert. Gleichzeitig werden ggf. Fluoreszenz-Moleküle angeregt, deren Emissions-Intensität in verschiedenen Filtern gemessen werden kann.

Die Analysen der Expressionsstärke von GFP-Varianten bzw. des FRET-Effekts wurden mit dem Durchflusscytometer FACS-Canto II von Becton Dickinson durchgeführt.

Je Ansatz wurden die Zellen eines 6-Wells 48 h nach der Transfektion geerntet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, anschliessend 0,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und 2 min bei RT inkubiert. Dann wurden 2 ml FACS-Puffer zugegeben, die Zellsuspension in 5 ml-FACS-Röhrchen überführt, zentrifugiert (300-g, 5 min, 4°C), das Pellet in 2 ml FACS-Puffer resuspendiert und die Röhrchen bis zur Messung auf Eis gelagert.

Zur Messung der Expressionsstärke von YFP wurde zunächst in einer Auftragung der Zell-Grösse gegen die Granularität (*forward/side-scatter* = FSC/SSC-Plot) die Population lebender Einzelzellen ausgewählt. Die Anregung des Fluorophors erfolgte mit dem 488 nm-Laser, die Messung der Fluoreszenz im Filter 530/30. Die Basislinie wurde so gelegt, dass untransfizierte Zellen eine mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) von 0 hatten; es wurden 10 000 Zellen pro Ansatz analysiert.

Zur FRET-Analyse wurde analog die Population lebender Zellen ausgewählt. Die Messung erfolgte mit den u. g. Einstellungen. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität im BP450/50-Filter gegen die im BP485/42-Filter aufgetragen. Basierend auf Kontrollen (Zellen, die mit YFP und CFP, sowie Zellen, die mit einem YFP-CFP-Fusionskonstrukt transfiziert waren) wurden in diesem Diagramm die zwei Regionen R2 (FRET-negative-Zellen), und R3 (FRET-positive Zellen) definiert (siehe 3.1.7, Abb. 3.10).

FACS-Puffer	1 % (v/v) FCS in PBS, 1 mM NaN <sub>3</sub> , 4°C
Cytometer-Einstellungen	FSC: PMT-Spannung: 71
FRET-Messung	SSC: PMT-Spannung: 236
	CFP: Anregung: 405 nm Laser, Messung BP450/50-Filter
	PMT-Spannung: 278
	Kompensation: keine
	YFP: Anregung: 488 nm Laser, Messung BP530/30-Filter
	PMT-Spannung: 401
	Kompensation: -1 % BP583/54, -11,4 % BP450/50,
	-26,7 % BP585/42
	CFP und FRET-YFP:
	Anregung: 405 nm Laser, Messung BP585/42-Filter
	PMT-Spannung: 312
	Kompensation: -2,2 % BP583/54, -64 % BP450/50

### Theoretischer Hintergrund der FRET-Messung

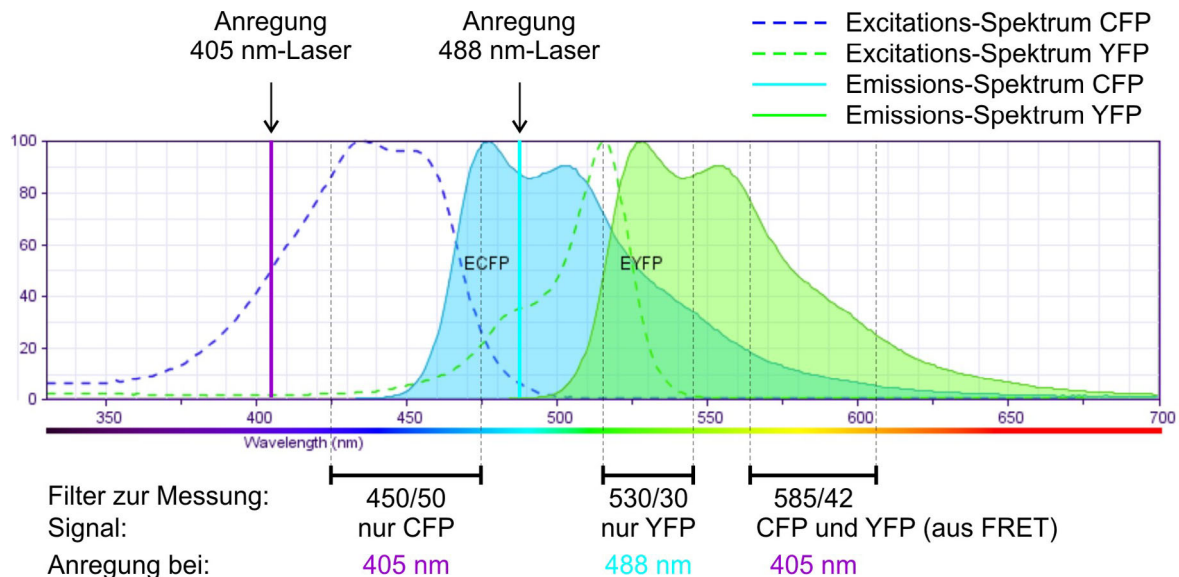
Bei dieser Form der Analyse macht man sich zunutze, dass zwischen zwei geeigneten Fluorophoren, die sich in räumlicher Nähe befinden, Resonanz-Energietransfer (FRET) stattfindet. Nach Anregung des Donor-Fluorophors wird ein Teil der Energie nicht als Fluoreszenzlicht emittiert, sondern durch FRET auf den Akzeptor-Fluorophor übertragen, von dem die Energie dann erst mit dessen spektralen Eigenschaften als Licht emittiert wird [163]. Nach STRYER gilt für die Effizienz dieses Energie-Transfers folgender Zusammenhang [164]:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad \text{mit } R_0 = 9.8 \cdot 10^3 \cdot \sqrt{\kappa^2 \cdot J(\lambda) \cdot n^{-4} \cdot Q} \quad (2.4)$$

Dabei steht E für die Effizienz, R für den Abstand der beiden Fluorophore (in nm),  $R_0$  für denjenigen Abstand, bei dem  $E = 50 \%$ .  $\kappa^2$  beschreibt die relative Orientierung der Übergangsdipole der Fluorophore,  $J(\lambda)$  das Integral der Überlappung der Donor-Emissions- und Akzeptor-Absorptions-Spektren, n den Brechungsindex des umgebenden Mediums und Q die Quantenausbeute des Donors. Weil R in der sechsten Potenz eingeht, nimmt die FRET-Effizienz mit zunehmendem Abstand sehr schnell ab und ist damit gut geeignet, um räumliche Nähe in nm-Dimensionen zu charakterisieren. Bei  $R = 2 \cdot R_0$  beträgt E nur noch 1,6 %. Ein geeignetes und weit verbreitetes FRET-Donor/Akzeptor-Paar stellen das cyan- und das gelb fluoreszierende Protein dar (CFP, YFP). Für die beiden Proteine gilt  $R_0 = 4,9$  nm; signifikanter FRET tritt also nur auf, wenn die beiden Fluorophore einen Abstand von weniger als 10 nm haben, was auf Protein-Ebene einer direkten Interaktion gleichkommt. Produziert man also zwei potentiell miteinander interagierende Proteine jeweils als Fusion mit CFP bzw. YFP, so tritt nur im Falle einer direkten Interaktion FRET auf.

Abb. 2.1 veranschaulicht die für die FACS-Messung verwendeten Anregungswellenlängen und Filter zur Messung der Fluoreszenzintensitäten in Bezug zu den Spektren von CFP und YFP. Für die FRET-Messung wird mit dem 405 nm-Laser ausschliesslich CFP angeregt. Dessen Emission wird im Bandpass-Filter 450/50 gemessen. Gleichzeitig erfolgt eine Messung der Fluoreszenzintensität im Filter 585/42. In diesem Bereich wird ebenfalls CFP gemessen, zusätzlich aber auch ggf. YFP, das aber nur durch Resonanz-Energie-Transfer angeregt werden kann. Findet also FRET statt, nimmt das Signal des Donors CFP im

450/50-Filter ab, das Signal des Akzeptors YFP im 585/42-Filter entsprechend zu. Zur Kontrolle wird darüber hinaus nach Anregung mit dem 488 nm-Laser unabhängig davon das Fluoreszenz-Signal von YFP im 530/30-Filter gemessen. Neben dem Auftreten eines FRET-Signals als Zeichen für potentielle Protein-Protein-Interaktionen erfolgte gleichzeitig über die Messung von CFP und YFP der Nachweis der Expression der Fusionsproteine in den untersuchten Zellen.



**Abb. 2.1 Spektrale Eigenschaften von CFP und YFP sowie Parameter zur FACS-Messung**

Bei Anregung mit dem 405 nm-Laser misst man im 450/50-Filter die Intensität der CFP-Emission, im 585/42-Filter die Summe der Intensitäten von CFP und ggf. von YFP, falls FRET stattfindet. Bei Anregung mit dem 488 nm-Laser wird nur YFP angeregt, dessen Intensität im 530/30-Filter gemessen wird.

(Die Spektren wurden mit dem »Fluorescence Spectrum Viewer« von BD Biosciences gezeichnet: [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/media/spectrumviewer/index.jsp](http://www.bdbiosciences.com/external_files/media/spectrumviewer/index.jsp)).

#### 2.4.5 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen eines 6-Well mit 1 ml PBS gewaschen und anschliessend mit 0,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung versetzt. Nach 2 min wurden 2 ml DMEM-Vollmedium zugesetzt und das gesamte Volumen in ein neues 6-Well überführt, in dem ein Deckglas vorgelegt war. 24 h später, nachdem die Zellen an das Glas adhärirt hatten, wurden die Zellen nach folgendem Schema für die fluoreszenzmikroskopische Analyse vorbereitet:

- Waschen: Medium absaugen, Zugabe von 2,5 ml PBS, absaugen
- Fixierung: Zugabe von 1 ml Fixierlösung, 15 min bei RT
- Waschen: 3x mit je 2,5 ml PBS/T, 5 min
- Färbung (Zellkerne): Zugabe von 1 ml DAPI-Färbelösung, 15 min bei RT
- Waschen: 3x mit je 2,5 ml PBS/T, 5 min
- Eindecken: 20 µl Eindeckmedium, aushärten ÜN bei RT

Die Analyse der Präparate erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop bei 630-facher-Vergrößerung.



PBS/T	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20
Fixierlösung	2 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
DAPI-Färbelösung	0,5 µg/ml DAPI in PBS
DAPI	1 µg/µl DAPI in H <sub>2</sub> O
Eindeckmedium	Mowiol 4-88, Roth 0713
Fluoreszenz-Mikroskop	9 % (w/w) Mowiol 4-88, 20 % (w/w) Glycerin, 90 mM Tris, pH 8,5
	Leica DMRX
	Bildaufnahme: CCD-Kamera Retiga-SRV, QImaging
	Bildverarbeitung: ImagePro 6.2-Software, MediaCybernetics

#### **2.4.6 HIV-Replikations-Assay**

Mit Hilfe des HIV-Replikations-Assays wurde ermittelt, welchen Einfluss die Produktion verschiedener Proteine auf die Virus-Partikelproduktion von HIV hat.

Dazu wurden die jeweiligen Konstrukte zusammen mit dem proviralen Plasmid pNL4-3 in HEK293T-Zellen transfiziert und nach 24 bzw. 48 h die Menge an Viruspartikeln im Zellkultur-Überstand quantifiziert. Falls die Konstrukte einen beliebigen Schritt des retroviralen Vermehrungszyklus nach der Integration beeinträchtigen, spiegelt sich das in einer veränderten Virusproduktionsrate wider. Mit dem Test lässt sich daher eine grosse Bandbreite viraler Mechanismen auf einmal abgreifen, ohne jedoch Rückschlüsse darauf zuzulassen, welcher Schritt im Detail betroffen ist.

Konkret wurden hierzu HEK293T-Zellen wie in 2.4.2 beschrieben mit dem proviralen Plasmid pNL4-3 (siehe 5.2.2) und dem zu untersuchenden Konstrukt cotransfiziert. Nach 6 h, noch bevor die Freisetzung erster Virionen erfolgt, wurde das Medium gewechselt, um die Transfektionsreagenzien zu entfernen. 24 h nach der Transfektion wurde der Zellkultur-Überstand geerntet, wie in 2.3.8 beschrieben aufgearbeitet und frisches Medium zu den Zellen gegeben. 48 h nach der Transfektion wurde erneut der Überstand geerntet. Die Zellen wurden je nach Fragestellung zur Herstellung eines Zelllysats (siehe 2.4.3) für Western-Blot-Analysen (siehe 2.3.6) verwendet oder für eine FACS-Analyse (siehe 2.4.4) aufbereitet.

Der Gehalt an p24 in den 24 h- und 48 h-Zellkulturüberständen, der ein Mass für die Menge an produzierten Virus-Partikeln ist, wurde mit Hilfe des p24-ELISAs (siehe 2.3.8) ermittelt. Die Replikations-Assays wurden jeweils in parallelen Dreifachansätzen durchgeführt; in den entsprechenden Diagrammen sind die Mittelwerte und der Standardfehler angegeben.

### **3. Ergebnisse**

---

#### **3.1 Identifizierung und Charakterisierung von Sam68-SH3-Bindern**

---

Im Hinblick auf die Frage, ob Sam68-SH3-Interaktionen eine Rolle bei der HIV-Replikation spielen, ist es zunächst erforderlich, die relevanten SH3-Bindungspartner von Sam68 zu kennen.

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, wurden bereits mehrere SH3-Domänen-haltige Proteine identifiziert, die mit Sam68 interagieren (siehe Tab. 1.4). Diese Ergebnisse basieren allerdings nicht auf systematischen Analysen, sondern sind das Ergebnis vieler Einzelarbeiten unterschiedlicher Gruppen aus den letzten 15 Jahren. Der Einsatz einer Phagen-Display-Bibliothek, die alle humanen SH3-Domänen abbildet (siehe 3.1.2), bietet hier den Vorteil, ein umfassendes Bild der höchst-affinen Sam68-SH3-Binder zu erhalten. Neben der potentiellen Entdeckung neuer Interaktionspartner eignet sich die Untersuchung von Sam68 aufgrund der Kenntnis gut charakterisierter Binder darüber hinaus zur Validierung und methodischen Weiterentwicklung des hier verwendeten Phagen-Display-Verfahrens (siehe 3.1.4), das unter der Koordination von Kalle SAKSELA (Haartmann Institute, Helsinki, Finnland) von dessen Arbeitsgruppe, der Arbeitsgruppe WAGNER und der Geneart AG entwickelt wurde [18].

Rekombinant hergestelltes Sam68 (siehe 3.1.1) wurde als Zielprotein im Bio-Panning eingesetzt, um neue SH3-Binder zu identifizieren und bereits bekannte zu verifizieren (siehe 3.1.4). Die Kandidaten aus dem Phagen-Display wurden anschliessend *in vitro* und *in vivo* detailliert als Binder charakterisiert (siehe 3.1.5 - 3.1.7).

##### **3.1.1 Herstellung von Sam68**

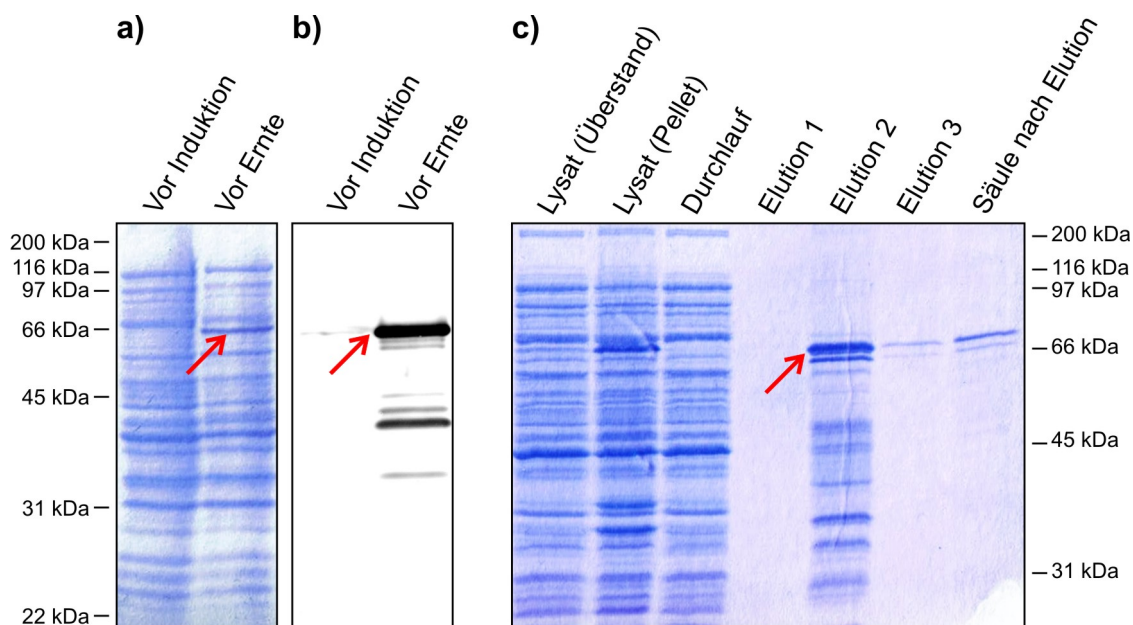
Da für das geplante Bio-Panning ausreichende Mengen des aufgereinigten Zielproteins benötigt werden, wurde Sam68 rekombinant in Bakterien hergestellt. Die dadurch fehlenden posttranslationalen Modifikationen dürften im Hinblick auf die Selektion von SH3-Bindern irrelevant sein, da SH3-Domänen typischerweise kurze hydrophobe Bereiche erkennen, die in der Regel nicht modifiziert sind [21].

Das humane *sam68*-Gen wurde mittels PCR von cDNA aus HEK293T-Zellen amplifiziert und in den Vektor pCR-XL-Topo kloniert (siehe 5.2.2). Das entstehende Plasmid Topo-Sam68 (siehe 5.2.3) diente als Ausgangspunkt für alle folgenden Sam68-Konstrukte.

Für die rekombinante Produktion in *E. coli* wurde *sam68* in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE-30 (siehe 5.2.2) kloniert, so dass das Protein N-terminal mit einem His-Tag (RGSH<sub>6</sub>) fusioniert wurde. Sam68 wurde dann wie in 2.3.1 beschrieben in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch an Ni-NTA aufgereinigt (siehe 2.3.3).

Während der Expression und Reinigung wurden Proben genommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung oder einen  $\alpha$ -Sam68-Western-Blot analysiert. Wie man Abb. 3.1a und b entnehmen kann, wurde Sam68 zwar produziert, allerdings bereits in den Bakterien teilweise wieder degradiert. Entsprechend waren in der zweiten Elutionsfraktion, die den Grossteil des eluierten Proteins enthielt, neben dem Volllänge-Sam68 auch verkürzte Proteine als Verunreinigung enthalten (Abb. 3.1c).

Die Ausbeute war mit etwa 1 mg pro l Bakterienkultur recht niedrig, aber für die folgenden Versuche ausreichend. Eine Steigerung von Ausbeute und Reinheit durch Veränderungen der Kultur- und Expressionsbedingungen (Bakteriendichte, Expressionsdauer, Temperatur) gelang nicht. Auch die Verwendung eines Sam68-Konstrukts mit für *E. coli* optimierter *Codon-usage* steigerte die Ausbeute nicht. GST-getagtes Sam68 wurde in noch stärkerem Masse degradiert (Daten nicht gezeigt). Wie im Folgenden dargestellt, konnte das rekombinant hergestellte Protein jedoch trotz der mässigen Qualität erfolgreich im Bio-Panning eingesetzt werden.



**Abb. 3.1 Expression und Reinigungsverlauf von His-Sam68**

**a)** SDS-PAGE/Coomassie-Analyse der Sam68-Expressionskultur vor Induktion und Ernte. Die Sam68-Bande ist mit einem Pfeil markiert. **b)** Western-Blot-Analyse der Expressionskultur mit einem  $\alpha$ -Sam68-Antikörper. Unterhalb der Sam68-Bande sieht man mehrere Degradationsprodukte. **c)** SDS-PAGE/Coomassie-Analyse des Reinigungsverlaufs von His-Sam68 mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Das gereinigte Protein ist v. a. in der 2. Elutionsfraktion enthalten, die auch viele Verunreinigungen/Abbauprodukte enthält.

### 3.1.2 Herstellung der SH3-Phagen-Bibliothek

Die hier verwendete SH3-Bibliothek enthält 291 verschiedene humane SH3-Domänen (siehe 5.3) und deckt damit fast das gesamte humane SH3-Proteom ab. Die Domänen wurden durch Vergleich mit repräsentativen SH3-Domänen durch BLAST-Suchabfragen

identifiziert [18]. Seitdem wurden noch 15 weitere Domänen gefunden (K. SAKSELA, persönliche Mitteilung, Stand Januar 2009), die zum Zeitpunkt der Arbeiten nicht in der Bibliothek vertreten waren. Weil SH3-Domänen-Wechselwirkungen typischerweise recht schwach sind (siehe 1.1), wurde für das Phagen-Display die Präsentation als Fusion mit dem Hauptoberflächenprotein p8 gewählt (polyvalentes Display), welches entsprechend der Grösse des eingesetzten Phagmids pJH in ca. 1600 Kopien pro Phagen-Partikel vorkommt. Wieviele SH3-Domänen tatsächlich präsentiert werden, ist unklar, da die Hülle ein Mosaik aus dem Fusionsprotein und dem Wildtyp-Protein ist (siehe 1.4).

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung der SH3-Phagen-Bibliothek standen 291 Bakterienstämme als Glycerinkulturen zur Verfügung, die jeweils mit einem der pJH-SH3-Phagmide (siehe 5.2.2) transformiert waren. Diese Kulturen wurden einzeln auf SOBAG-Platten ausgetüpfelt, die Kolonien am nächsten Tag mit YT-AG-Medium abgespült und soweit nötig in Medium verdünnt. Anschliessend wurde wie in 2.2.1 beschrieben unter Einsatz des Helferphagen M13KO7 ein Phagenüberstand hergestellt, wobei die Produktionszeit auf 5 h begrenzt wurde, um zu verhindern, dass sich Unterschiede in der Phagenherstellungsrate überproportional stark auswirken.

Die **Titerbestimmung** der SH3-Bibliothek ergab einen Wert von  $6 \cdot 10^{10}$  cfu/ml.

### **3.1.3 Qualitätskontrolle der SH3-Phagen-Bibliothek**

Die wichtigsten Kenngrössen zur Charakterisierung von Bibliotheken sind die Diversität und die Vollständigkeit.

Zur Beurteilung der **Diversität** wurden von Einzelklonen der Titerbestimmung ausgehend 43 Phagmide isoliert und der Bereich der SH3-Domänen sequenziert. Dabei wurden 28 Sequenzen je einmal, 3 je zweimal und 3 je dreimal erhalten. Statistisch wären 37 Einzelsequenzen und drei Doppelsequenzen zu erwarten. Das Auftreten der dreimal vorkommenden Sequenzen (SH3-Domänen #145, #165, #177) zeigt zwar, dass die Diversität nicht optimal war, aber weil dennoch 65 % Einzelsequenzen erhalten wurden, ist die Bibliothek gut für ein Bio-Panning geeignet.

Die Frage nach der **Vollständigkeit**, also ob alle 291 SH3-Domänen auch in der Bibliothek enthalten sind, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Eine experimentelle Überprüfung scheidet aus, da man zum Nachweis von 95 % der Varianten bereits 872 Klone sequenzieren müsste, wenn man von einer Gleichverteilung ausgeht. Biologisch gesehen ist allerdings die Annahme gerechtfertigt, dass alle SH3-Phagen mit vergleichbarer Effizienz produziert werden, weil die SH3-Domänen annähernd die gleiche Grösse und eine weitgehend konservierte Struktur haben. Unter dieser Prämisse wäre eine Bibliothek mit  $2 \cdot 10^3$  Phagen bereits zu 99,9 % vollständig, so dass angesichts des Titors von  $6 \cdot 10^{10}$  cfu/ml davon auszugehen ist, dass die SH3-Phagen-Bibliothek zu 100 % vollständig ist, selbst

wenn man die nicht optimale Diversität berücksichtigt (zur Berechnung der statistischen Parameter siehe [165]).

Als weiterer Test zur Überprüfung der Qualität der Bibliothek wurde ein **Bio-Panning** (siehe 2.2.3 und vgl. 3.1.4) mit rekombinant hergestelltem His-Nef durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich damit die Ergebnisse von KÄRKKÄINEN *et al.* [18] reproduzieren lassen. Der Phagen-Titer der Elution betrug  $6,4 \cdot 10^6$  cfu/ml bei Nef gegenüber  $5,2 \cdot 10^5$  cfu/ml beim Negativ-Kontrollprotein GST, was auf eine Anreicherung von Bindern schliessen lässt. Bei der Sequenzierung von 10 Phagmiden der eluierten Phagen wurde in Übereinstimmung mit den publizierten Daten 9x die SH3-Domäne Hck (#227) identifiziert, während bei GST 10 verschiedene SH3-Domänen ohne Bezug zu Nef erhalten wurden. Die drei o. g. in der Bibliothek überrepräsentierten Binder waren nicht darunter, was bestätigt, dass die Diversität nicht beeinträchtigt ist. Darüber hinaus wurden bei Test-Pannings mit verschiedenen Proteinen immer wieder die Domänen #19, #72, #144, #272 und #290 als Hintergrund-Binder isoliert, was darauf hindeutet, dass sie zu einem gewissen Grad unspezifisch mit den verwendeten Materialien (Magnetische Beads, Plastik, zum Blocken benutztes BSA) interagieren.

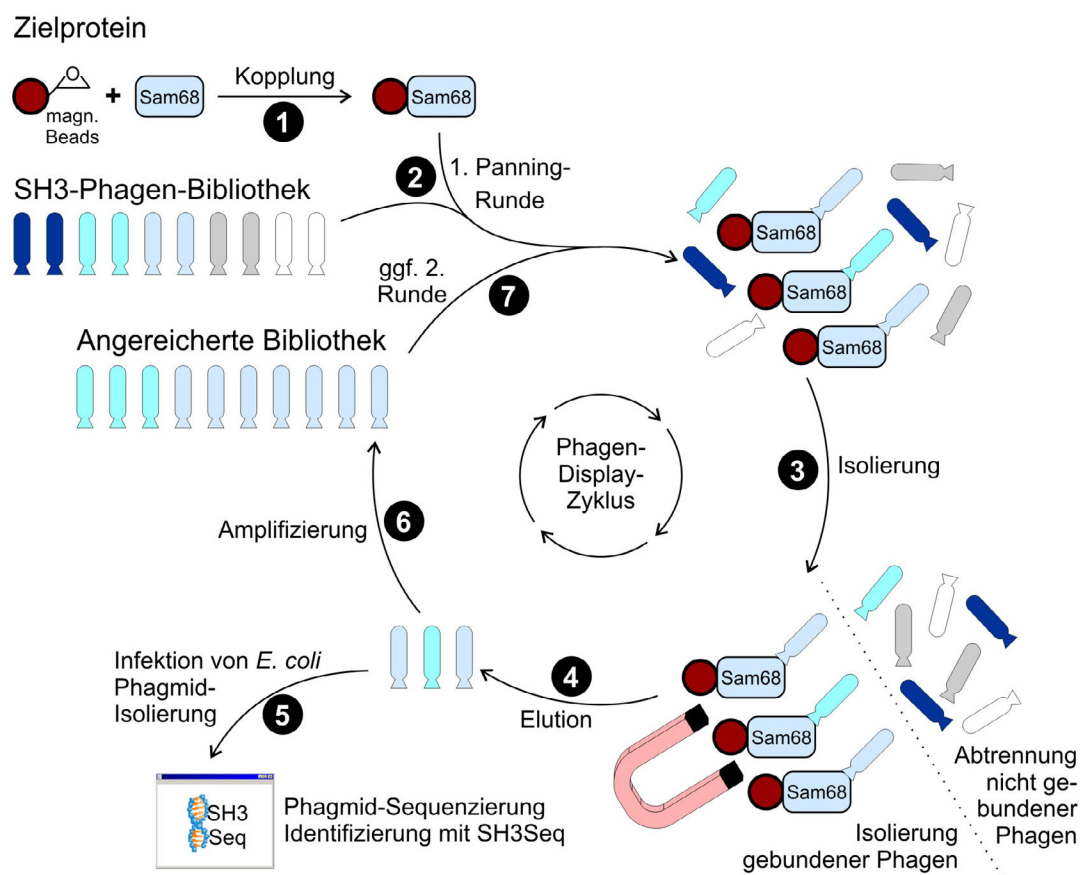
#### **3.1.4 Bio-Panning zur Identifizierung von Sam68-SH3-Wechselwirkungen**

Das Bio-Panning von Sam68 gegen die SH3-Phagen-Bibliothek wurde wie in 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Das Protokoll basiert auf den Arbeiten der Arbeitsgruppe von K. SAKSELA mit verschiedenen Optimierungen, die auf Erfahrungen der Arbeitsgruppe WAGNER beruhen ([166,167] und eigene Arbeiten).

Das Bio-Panning wurde gemäss dem Schema in Abb. 3.2 durchgeführt: 10 µg des rekombinant hergestellten His-Sam68 bzw. von GST als Negativ-Kontrolle wurden kovalent an Epoxid-aktivierte magnetische Beads gebunden. Der Vorteil dieser ungerichteten Bindung ist, dass die Proteine dadurch an den verschiedensten Stellen an die Matrix gebunden werden, wodurch folglich alle potentiellen Bindestellen für die Phagen zugänglich sind, ohne von den Beads abgeschirmt zu werden. Magnetische Beads erlauben eine einfache und effiziente Durchführung des Bio-Pannings und führen bei gleicher Ausbeute zu einer spezifischeren Bindung als bei Verwendung herkömmlicher Plastikoberflächen [168]. Die Bibliothek wurde in BSA-haltigem Blocking-Puffer vorinkubiert, um unspezifischen Wechselwirkungen vorzubeugen, bevor sie zu den Beads gegeben wurde. Insgesamt wurden pro Ansatz  $6 \cdot 10^9$  cfu eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation wurden 10 Waschschrte mit einem Waschpuffer niedriger Stringenz (PBS mit 0,05 % (v/v) Tween-20) durchgeführt, um die schwachen SH3-Wechselwirkungen nicht zu beeinträchtigen. Anschliessend wurden die an Sam68 gebundenen Phagen durch eine pH-Wert-Erniedrigung eluiert.

Die von den Sam68-Beads eluierte Phagenlösung hatte einen Titer von  $2,3 \cdot 10^7$  cfu/ml, die von den GST-Beads eluierte nur  $5,2 \cdot 10^5$  cfu/ml, was einer 44-fachen Anreicherung von Sam68-Bindern gegenüber dem Hintergrund entspricht. Die Phagmide von 74 Kolonien wurden isoliert, sequenziert und mit dem Programm SH3Seq (siehe 5.4) automatisiert ausgewertet. Die dabei identifizierten SH3-Domänen sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Die Phagen aus dem Bio-Panning wurden parallel dazu für eine zweite Panning-Runde amplifiziert. Die Titer der erhaltenen angereicherten Bibliotheken betrugen  $6,0 \cdot 10^{10}$  cfu/ml bei Sam68 und  $6,6 \cdot 10^8$  cfu/ml bei GST. Nach analoger Durchführung des Bio-Pannings wurden mit Sam68 nur noch  $4,6 \cdot 10^6$  cfu/ml erhalten, die Phagen-Konzentration bei GST lag unter der Nachweisgrenze. Weitere Panning-Runden konnten aufgrund der Abreicherung zu so niedrigen Titern nicht durchgeführt werden. Eine weitere Amplifikation der Phagen-Eluate ist nicht sinnvoll, weil bei verlängerten Phagen-Produktionszeiten Veränderungen der relativen Klon-Verteilung auftreten können. Die Phagmide von 13 infizierten Bakterienkolonien der zweiten Runde wurden sequenziert; die Ergebnisse sind ebenfalls in Tabelle 3.1 wiedergegeben.



**Abb. 3.2 Phagen-Display-Zyklus**

Sam68 wurde als Zielprotein an magnetischen Epoxy-Beads immobilisiert (1) und mit der SH3-Phagen-Bibliothek inkubiert (2). Zur Isolierung (3) wurden die Sam68-SH3-Phagen-Komplexe mit einem Magneten fixiert und nicht gebundene Phagen durch Waschen entfernt. Die Sam68-bindenden Phagen wurden durch pH-Wert-Erniedrigung eluiert (4) und zur Infektion von *E. coli* eingesetzt. Aus Einzelklonen wurden die Phagmide isoliert, sequenziert und mit dem Programm SH3Seq (siehe 5.4) analysiert (5). Ausserdem wurden die Phagen direkt für eine Folge-Runde amplifiziert (6) und erneut in den Phagen-Display-Zyklus eingesetzt (7).

**Tabelle 3.1 Im Bio-Panning gegen Sam68 identifizierte SH3-Domänen**

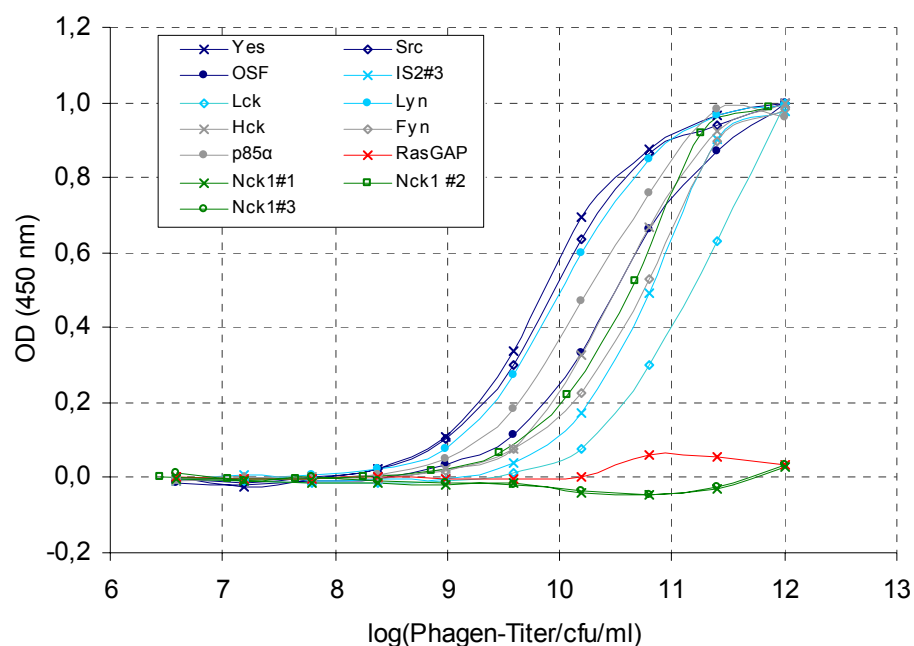
Die Proteine sind nach Häufigkeit in Runde 1 sortiert. Insgesamt wurden 74 Phagmide aus der ersten und 13 Phagmide aus der zweiten Bio-Panning-Runde sequenziert.

SH3 Nr.	SH3 Name	Häufigkeit Runde 1	Häufigkeit Runde 2	Bemerkungen
235	p85 $\alpha$	8	1	Bekannter Sam68-Binder
029	Yes	6		Bekannter Sam68-Binder
207	Intersectin 2 #3	6		
031	Src	5	3	Bekannter Sam68-Binder
226	Lyn	5	3	Bekannter Sam68-Binder
206	OSF ( <i>Osteoclast stimul. factor</i> )	3		
227	Hck	3		
239	Nck1 #2	3	1	Nck1 #1 als Sam68-Binder bekannt
122	Sorting Nexin 9	2		
144	ARHGEF9	2		
165	CIN85 #2	2		In Bibliothek überrepräsentiert
166	CMS #1	2		
228	Fyn	2		Bekannter Sam68-Binder
017	Homology to PRAX-1 #2	1	1	
184	Homology to Grb2	1	1	Grb2 als Sam68-Binder bekannt
<b>Je 1x in Runde 1 identifiziert (SH3 Nr. / Name):</b>				
<b>030</b> Fgr, <b>033</b> Grb2, <b>045</b> Itk, <b>095</b> p47-phox #2				Bekannte Sam68-Binder
<b>006</b> AbiBP3, <b>019</b> RelA associated inhibitor #1, <b>074</b> ASPP1, <b>077</b> Homology to NESCA, <b>098</b> CD2BP1, <b>135</b> Homology to SAMSN1, <b>151</b> DLG2, <b>152</b> DLG3, <b>159</b> MPP6, <b>168</b> Nck2 #2, <b>173</b> MIA2, <b>179</b> Amphiphysin, <b>191</b> Homology to UBASH3A, <b>208</b> Intersectin 1 #3, <b>222</b> Homology to Abl-philin 2, <b>246</b> Btk, <b>250</b> Homology to GEFs (KIAA1010) #2, <b>253</b> Predicted protein for MGC:32065, <b>265</b> Predicted protein FLJ00204 #1				019 als Hintergrund-Binder bekannt
<b>Je 1x in Runde 2 identifiziert (SH3 Nr. / Name):</b>				
<b>060</b> Homology to Intersectin, <b>230</b> CrkL #1, <b>272</b> Predicted protein of a human BAC				272 als Hintergrund-Binder bekannt

Wie man den Daten der Tabelle entnehmen kann, wurde beim Bio-Panning mit Sam68 kein einzelner dominanter Binder erhalten, wie es bei Nef der Fall war. Stattdessen wurde eine Vielzahl verschiedener SH3-Domänen gefunden (41 Stück), die unterschiedlich häufig vertreten waren. Unter den 41 identifizierten SH3-Domänen befinden sich 9 der 17 bekannten Sam68-Binder, davon 4 auf den ersten 5 Plätzen, was dafür spricht, dass eine Sam68-spezifische Anreicherung stattgefunden hat. Die restlichen 8 Domänen wurden wahrscheinlich nicht identifiziert, weil entweder die Stichprobe zu klein oder die Affinität zu niedrig für das gewählte Selektionsverfahren ist. Viele Domänen werden hier erstmals als Sam68-Binder beschrieben, 8 davon unter den 15 häufigsten.

### 3.1.5 Phagen-ELISA zur quantitativen Analyse der Sam68-SH3-Interaktionen

Die Stichprobe der SH3-Domänen aus dem Bio-Panning ist zu klein, um anhand der Häufigkeitsverteilung Aussagen über die relativen Affinitäten zu Sam68 machen zu können. Daher wurden von den SH3-Phagen, die wenigstens 3x identifiziert wurden, Einzelphagen-Überstände für eine ELISA-Analyse hergestellt. Darüber hinaus wurden zur Analyse Phagen-Überstände der drei Nck1-Domänen herangezogen, da im Bio-Panning eine Bindung der Nck1-SH3-Domäne #2 beobachtet wurde, während in der Literatur eine Bindung nur für Domäne #1 beschrieben ist. Ausserdem wurde der Phage Fyn (#228) analysiert, da seine Interaktion in der Literatur gut beschrieben ist, sowie Lck (#225), das zwar als Binder beschrieben ist, aber im Bio-Panning wahrscheinlich aufgrund seiner niedriger Affinität nicht identifiziert wurde. Als Negativkontrolle wurde die SH3-Domäne von RasGAP (#188) gewählt, da in der Literatur gezeigt wurde, dass sie nicht mit Sam68 interagiert [73,75]. Zur Durchführung des Phagen-ELISAs wurde je 1 µg Sam68 pro Well einer 96-Well-Platte gebunden, Verdünnungsreihen der Phagenüberstände zugegeben und schliesslich die gebundenen Phagen nach gründlichem Waschen mit einem HRP-gekoppelten  $\alpha$ -M13-Antikörper quantifiziert (siehe 2.2.4). Die erhaltenen Bindungskurven sind in Abb. 3.3 gezeigt.

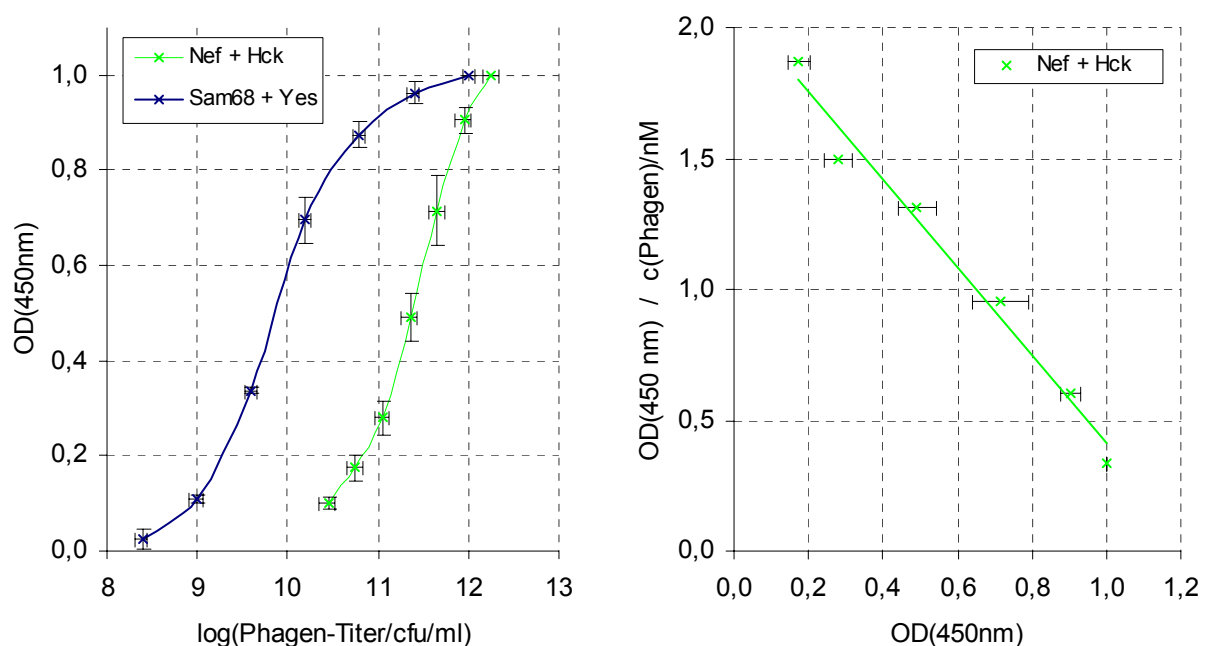


**Abb. 3.3 Phagen-ELISA zur Abschätzung der Stärke der SH3-Sam68-Bindungen**

Je 1 µg Sam68 wurde an die Wells einer ELISA-Platte gebunden. Nach Inkubation mit einer Verdünnungsreihe der Phagenüberstände wurde zur Detektion gebundener Phagen ein HRP-gekoppelter  $\alpha$ -M13-Antikörper zugegeben und der ELISA mit TMB-Substratlösung entwickelt. Die erhaltenen OD(450 nm)-Werte wurden normiert und gegen den Logarithmus der Phagen-Konzentration aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen ELISAs. Die Negativkontrolle (RasGAP) ist rot eingefärbt.



Die Bindungskurven haben bei halblogarithmischer Auftragung den typischen sigmoiden Verlauf einer einfachen Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung, wie es für die Bindung von SH3-Domänen an ein PxxP-Motiv zu erwarten ist. Die drei stärksten Binder waren Yes, Src und Lyn, alles Vertreter der Src-Kinasen. Die Fyn-SH3-Domäne befand sich bei den schwächeren Bindern, während Lck mit deutlichem Abstand den schwächsten Bindungs-partner darstellte, was gut mit den Bio-Panning-Häufigkeiten korreliert. RasGAP (rote Kurve) band erwartungsgemäss nicht. Für Nck (grüne Kurven) bestätigte sich die auf den Bio-Panning-Daten beruhende Vermutung, dass nur die zweite SH3-Domäne an Sam68 bindet. Aus dem Diagramm würden sich zwar relative Unterschiede der Bindungsaffinitäten quantifizieren lassen, indem man z. B. die Phagen-Konzentrationen ermittelt, bei denen die halbmaximale Bindung erreicht wird, aber für eine absolute Quantifizierung der Bindungskonstanten müsste man die Konzentration der SH3-Domänen kennen. Die Anzahl der SH3-Domänen pro Phagenpartikel ist jedoch unbekannt.



**Abb. 3.4 Phagen-ELISA-Analyse der Interaktionen von Nef mit Hck sowie Sam68 mit Yes**

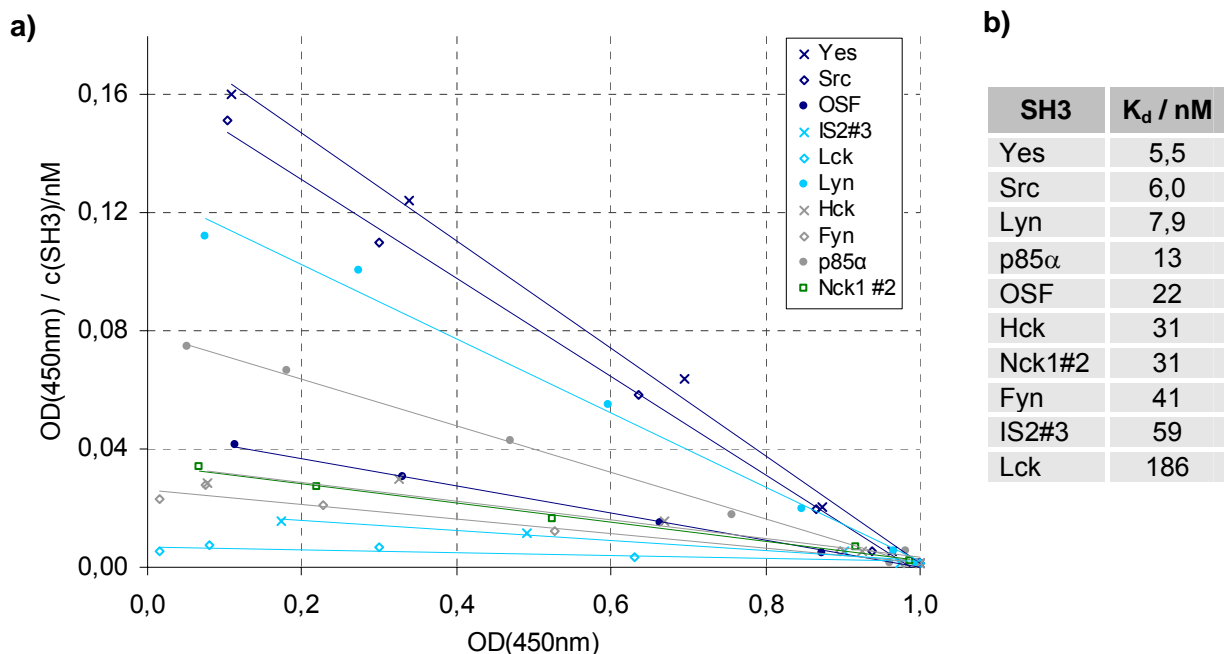
Der Phagen-ELISA wurde analog zu Abb. 3.3 durchgeführt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen ELISAs  $\pm$  Standardfehler.

**a)** Halblogarithmische Auftragung der normierten OD(450 nm)-Werte gegen die Phagen-Konzentration. **b)** SCATCHARD-Plot der Nef-Hck-Werte. Aus der Steigung ergibt sich ein  $K_d$ -Wert von 0,60 nM.

Um dennoch absolute Affinitäten abschätzen zu können, wurde ein Vergleich mit der Interaktion zwischen der SH3-Domäne von Hck und dem HIV Nef-Protein angestellt. LEE *et al.* ermittelten für diese Interaktion mittels SPR-Messungen den Wert der Dissoziationskonstante von  $K_d = 250$  nM, was einer der stärksten bekannten SH3-Interaktionen entspricht [17]. Der Phagen-ELISA wurde daher analog mit dem Hck-Phagen und rekombinant

hergestelltem His-Nef durchgeführt. Abb. 3.4a zeigt die erhaltene Bindungskurve (grün) im Vergleich mit der Sam68-Yes-Bindungskurve (blau). Die Gegenüberstellung zeigt, dass die Sam68-Yes-Interaktion deutlich stärker ist. Durch eine Auftragung der Nef-Hck-Werte nach SCATCHARD (Abb. 3.4b) lässt sich aus der Steigung der  $K_d$ -Wert ermitteln (Steigung =  $-1 / K_d$ ). Die Ausgleichsgerade hatte eine Steigung von  $-1,69 / \text{nM}$ , woraus sich für die Interaktion des Phagen mit Nef ein  $K_d$ -Wert von  $0,60 \text{ nM}$  ergibt. Mit dem Literaturwert von  $250 \text{ nM}$  lässt sich ein Korrekturfaktor von ca. 420 SH3-Domänen pro Phagenpartikel errechnen.

Trägt man analog dazu die Werte des Sam68-Phagen-ELISAs unter Einberechnung dieses Korrekturfaktors nach SCATCHARD auf (Abb. 3.5a), so lassen sich aus den Steigungen die zugehörigen  $K_d$ -Werte ermitteln (Abb. 3.5b).



**Abb. 3.5 SCATCHARD-Plot der Bindungskurven des Sam68-Phagen-ELISAs**

**a)** Auftragung der transformierten Daten aus Abb. 3.3 unter Einbeziehung des Korrekturfaktors aus Abb. 3.4. **b)** Errechnete  $K_d$ -Werte für die getesteten Sam68-SH3-Interaktionen, aufsteigend sortiert.

Die ermittelten  $K_d$ -Werte liegen im niedrigen nanomolaren Bereich, was für SH3-Domänen-Wechselwirkungen ungewöhnlich stark ist. Diese sind normalerweise mit Dissoziationskonstanten, die im niedrigen mikromolaren Bereich liegen, um einen Faktor von 100 - 1000 schwächer. Es sei daher betont, dass die hier errechneten  $K_d$ -Werte den Charakter einer Schätzung haben, weil sie auf dem Vergleich mit der Nef-Hck-Interaktion beruhen. Ausserdem gelten sie nur für das artifizielle System der Interaktion von Sam68 mit den jeweils viele SH3-Domänen-tragenden Phagen (siehe hierzu auch Diskussion in 4.1).

Eine weitere Analysemöglichkeit der ELISA-Daten stellt die Methode nach HILL dar. Die Auftragung (nicht gezeigt) von  $\log(c(\text{Phage}))$  gegen  $\log(1/OD-1)$  liefert eine Gerade mit

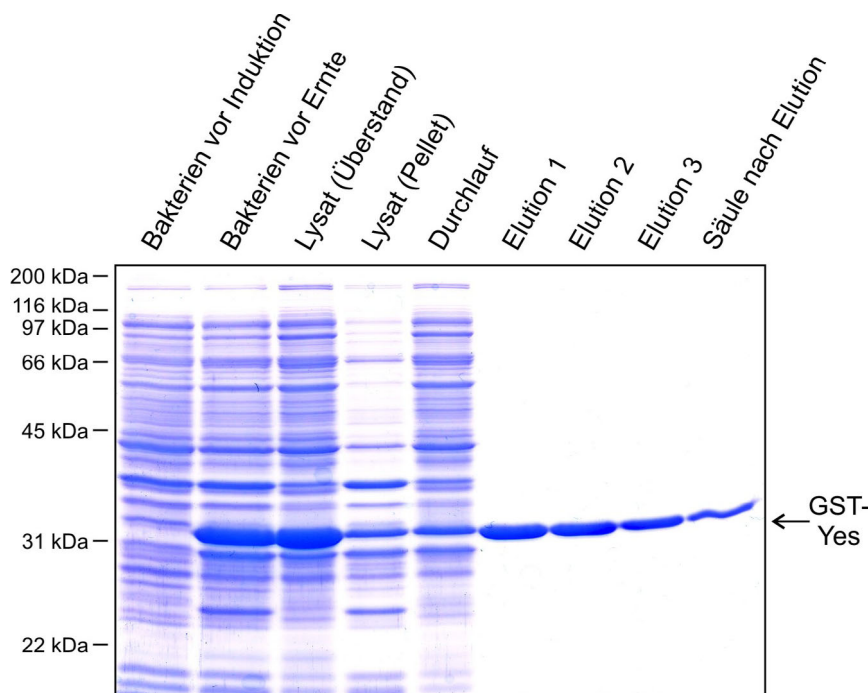
Steigung  $-1/\alpha$ , wobei  $\alpha$  für den sog. HILL-Koeffizienten steht, der ein Mass für die Kooperativität der Bindung ist. Falls keine Kooperativität stattfindet, was für die SH3-Sam68-Interaktion zu erwarten ist, beträgt der HILL-Koeffizient 1. Tatsächlich ergibt sich für Yes, OSF, Lyn und Fyn der Wert 1,0, die Werte für die anderen SH3-Domänen schwanken zwischen 0,9 und 1,1, was mit den Erwartungen gut übereinstimmt.

### 3.1.6 Pull-Down-Assay zur Untersuchung der Sam68-SH3-Interaktionen *in vitro*

Aufgrund ihres quantitativen Charakters liefern die oben dargestellten ELISA-Analysen zwar viele interessante Kenngrössen, aber sie basieren auf der Verwendung von rekombinant hergestelltem Sam68. Der grösste Nachteil dabei ist, dass das in Bakterien hergestellte Protein nicht posttranslational modifiziert ist, obwohl Sam68 *in vivo* umfangreich verändert wird (siehe 1.3).

Um dieses Problem zu adressieren, wurden Pull-Down-Assays mit rekombinant hergestellten GST-SH3-Domänen und einem Sam68-haltigen Lysat eukaryotischer Zellen durchgeführt (siehe 2.3.7).

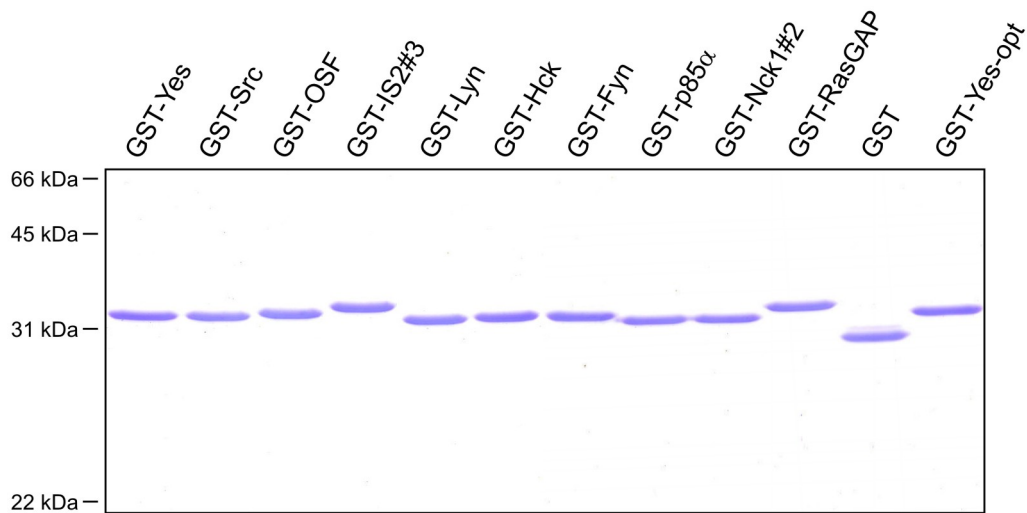
Zur Herstellung der GST-SH3-Domänen wurden die entsprechenden DNA-Abschnitte aus den SH3-Phagmiden in einen GST-Expressionsvektor umklontiert und die Fusionsproteine anschliessend wie in 2.3.2 beschrieben affinitätschromatographisch an Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Abb. 3.6 zeigt exemplarisch den Reinigungsverlauf von GST-Yes, Abb. 3.7 Aliquots aller fertig aufgereinigten SH3-Domänen.



**Abb. 3.6**  
**SDS-PAGE/Coomassie-**  
**Analyse des Reinigungs-**  
**verlaufs von GST-Yes**

Bei allen Schritten der Reinigung wurden Aliquots entnommen, per SDS-PAGE aufgetrennt und die enthaltenen Proteine durch Coomassie-Färbung visualisiert.

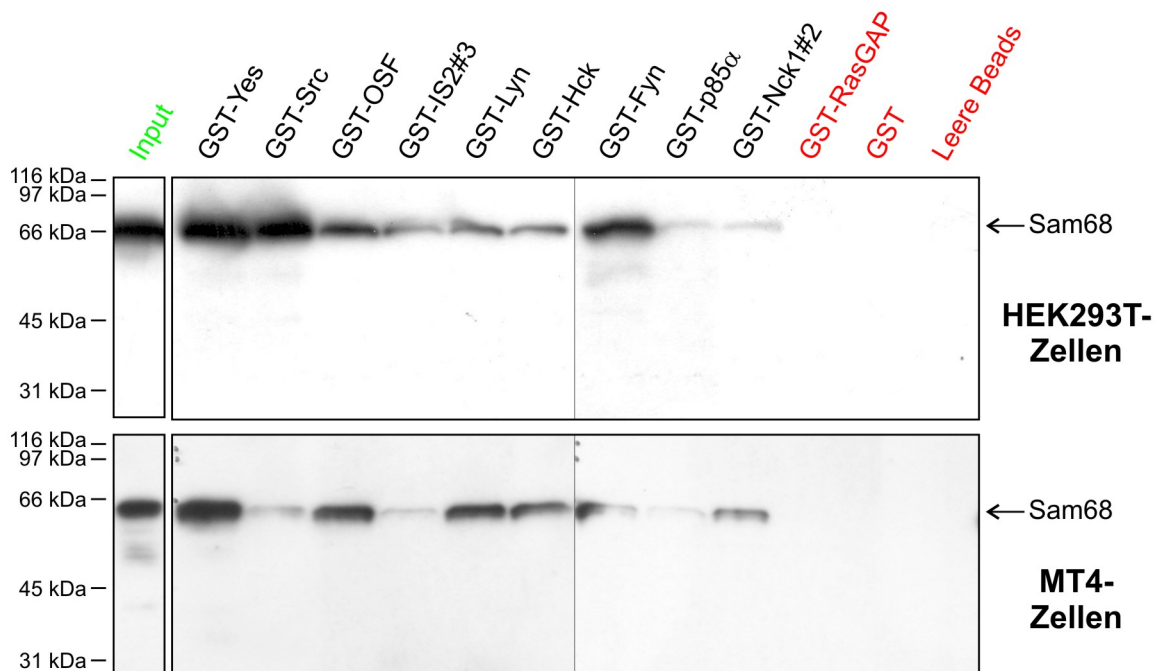
Die Fusionsproteine liessen sich mit hoher Ausbeute (zwischen 9 und 12 mg aus je 250 ml Bakterienkultur) und sehr guter Reinheit gewinnen, was v. a. auf die geringe Grösse (ca. 6 kDa) und kompakte Faltung der SH3-Domänen zurückzuführen sein dürfte.



**Abb. 3.7 SDS-PAGE/Coomassie-Analyse der gereinigten GST-SH3-Domänen**

Es wurden jeweils 2 µg Protein je Spur geladen. Die Fusions-Proteine haben eine Grösse von ca. 33 kDa, GST 29 kDa. Bzgl. GST-Yes-opt siehe 3.3.2.

Je 50 µg der GST-SH3-Proteine wurden ungerichtet an magnetische Epoxy-Beads gekoppelt und anschliessend über Nacht mit je 2,5 mg eines Zelllysats der eukaryotischen Zelllinien HEK293T (embryonale Nierenfibroblasten) bzw. MT4 (T-Zellen) inkubiert (siehe 2.4.1). Anschliessend wurden die Beads gründlich gewaschen, gebundene Proteine eluiert und Sam68 im Western-Blot detektiert (siehe Abb. 3.8).



**Abb. 3.8 Sam68-Pull-Down-Assay mit verschiedenen SH3-Domänen**

Je 50 µg der gereinigten GST-SH3-Domänen wurden an magnetischen Beads immobilisiert und mit 2,5 mg Zelllysats von HEK293T-Zellen (oberer Teil) oder MT4-Zellen (unterer Teil) inkubiert. Gebundenes Protein wurde eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Sam68 im Western-Blot detektiert. Als Negativkontrollen (rot) dienten Beads mit GST-RasGAP und GST sowie leere Beads, die analog behandelt wurden. Als Positivkontrolle für den Western-Blot wurden je 50 µg Zelllysats aufgetragen (Input, grün).

Der Pull-Down-Assay liefert eine unabhängige Bestätigung, dass die mittels Phagen-Display gefundenen SH3-Domänen *in vitro* mit Sam68 interagieren. Für eine quantitative Auswertung ist das verwendete Western-Blot-Format nicht geeignet, ein optischer Vergleich der Bandenintensitäten erlaubt jedoch die Abschätzung relativer Unterschiede. In Übereinstimmung mit den Daten des Phagen-ELISAs wurden bei den SH3-Domänen von Yes und Src die stärksten Sam68-Signale erhalten. Dabei war allerdings auch auffällig, dass manche SH3-Domänen mit dem Sam68 aus den beiden verschiedenen Zelllinien in unterschiedlichem Ausmass interagierten, insb. die Src-SH3-Domäne wies eine deutlich schwächere Wechselwirkung mit Sam68 aus MT4-Zellen als aus HEK293T-Zellen auf. Man beachte auch, dass das Sam68 aus den beiden Zelltypen auf leicht unterschiedlichen Höhen läuft, was auf Variationen im Muster der posttranslationalen Sam68-Modifikationen hindeutet. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass posttranslationale Modifikationen keine essentielle Voraussetzung für die Sam68-SH3-Wechselwirkungen sind, diese aber doch modulieren können.

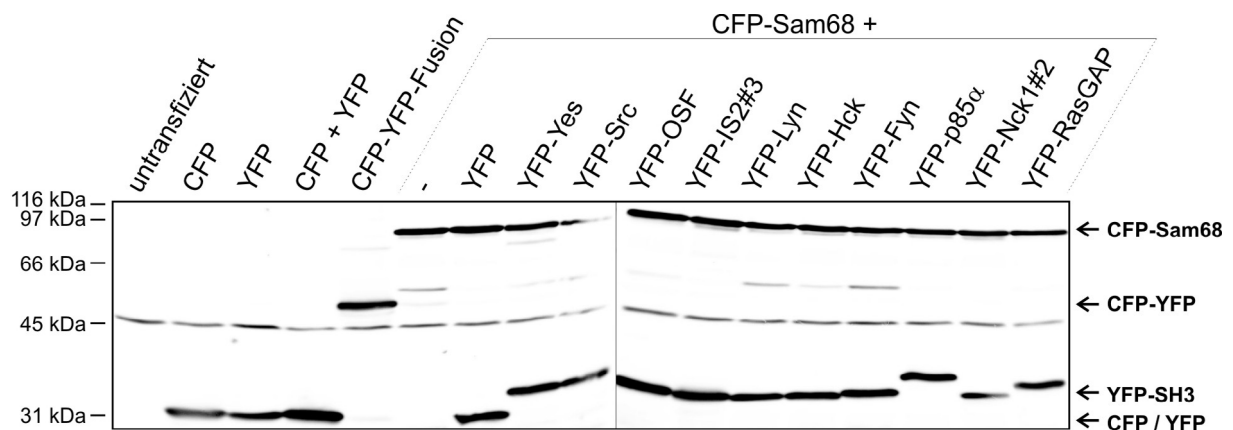
### **3.1.7 FRET-Analyse zur Untersuchung der Sam68-SH3-Interaktionen *in vivo***

Als Nächstes sollte überprüft werden, ob die bisher gezeigten Interaktionen zwischen Sam68 und den SH3-Domänen-Kandidaten auch *in vivo* stattfinden. Trotz aufwändiger Optimierungsversuche gelang es nicht, Immunpräzipitations-Analysen durchzuführen, die häufig zum Nachweis von *in vivo*-Interaktionen eingesetzt werden. Die Ursache könnte in der prinzipiell recht schwachen Wechselwirkung von SH3-Domänen mit ihren Liganden liegen. Bereits beim Pull-Down-Assay war es nötig, sehr grosse Mengen Zelllysate einzusetzen, um die Sam68-SH3-Wechselwirkungen nachzuweisen.

Als Alternative wurde daher ein durchflusscytometrisches FRET-Analyse-Verfahren in Anlehnung an die Methode von HE *et al.* entwickelt [169] (zum theoretischen Hintergrund und der praktischen Umsetzung des Verfahrens siehe 2.4.4). Das Verfahren ist einer IP insofern überlegen, als hier die Interaktion in lebenden Zellen und unter vollständiger Beibehaltung der Kompartimentierung studiert werden kann. Ein Nachteil besteht jedoch darin, dass die zu untersuchenden Proteine mit GFP-Varianten fusioniert werden müssen, was eventuell Einfluss auf die Interaktion haben kann.

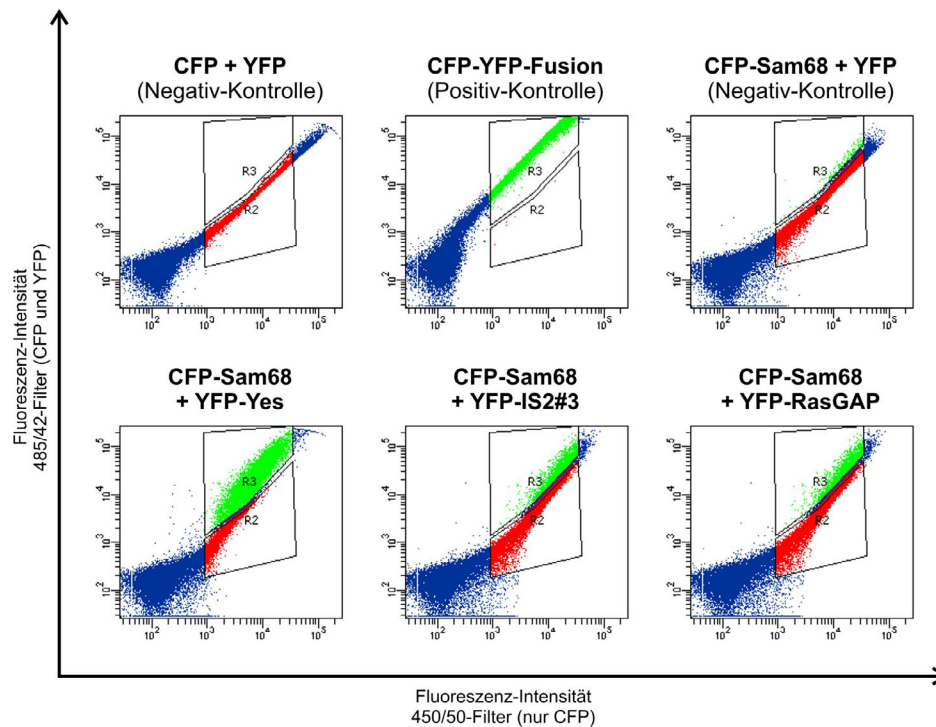
Für die Analysen wurden zunächst entsprechende FRET-Konstrukte hergestellt, die auf den Vektoren pECFP und pEYFP von Clontech basieren (siehe 5.2.2): Sam68 fusioniert mit CFP, die SH3-Domänen fusioniert mit YFP sowie ein CFP-YFP-Fusionsprotein als Positiv-Kontrolle (siehe 5.2.3). Die zu untersuchenden Plasmide wurden in HEK293T-Zellen transfiziert und die Zellen 48 h später durchflusscytometrisch untersucht (siehe 2.4.2 und 2.4.4). Konkret wurden für die FACS-Analyse Transfektionen mit CFP bzw. CFP-Sam68

sowie YFP bzw. den YFP-Expressionskonstrukten durchgeführt. Eine Western-Blot-Analyse mit einem  $\alpha$ -GFP-Antikörper (erkennt alle GFP-Varianten) bestätigte, dass alle Proteine in annähernd gleichen Mengen und mit den erwarteten Grössen produziert worden waren (Abb. 3.9). Abb. 3.10 zeigt exemplarisch einige repräsentative FACS-Diagramme, Abb. 3.11 die quantitative Auswertung aller untersuchten Proteinkombinationen. Zur Auswertung wurden basierend auf den Kontrollkonstrukten die zwei Regionen R2 und R3 in den Diagrammen definiert, so dass die Zellen der Negativ-Kontrolle (CFP und YFP) gerade noch in R2 lagen und mittlere Werte für die CFP-Fluoreszenz erhalten wurden. Zellen in R3 wurden dann als FRET-positive Zellen quantifiziert.



**Abb. 3.9 Western-Blot Analyse zum Nachweis der Produktion der CFP/YFP-Varianten**  
HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen Kombinationen der CFP- und YFP-Varianten transfiziert und nach 48 h lysiert. Je 50  $\mu$ g des Zelllysats wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem  $\alpha$ -GFP-Antikörper im Western-Blot analysiert. Der Antikörper kreuzreagiert mit einem zellulären Protein von ca. 45 kDa Grösse, das als Ladekontrolle betrachtet werden kann. Alle Proteine wurden in annähernd gleichen Mengen und in der erwarteten Grösse produziert.

Das stärkste Signal wurde erwartungsgemäss stets für die Positiv-Kontrolle CFP-YFP erhalten. Da die beiden Proteine Teil desselben Polypeptids sind und damit auch exakt im stöchiometrischen Verhältnis 1 : 1 stehen, sind die Voraussetzungen für den Energietransfer von CFP auf YFP optimal erfüllt. Bei den Kontrollansätzen, in denen die YFP-Fusionsproteine alleine bzw. zusammen mit CFP exprimiert wurden, wurde niemals ein FRET-Signal erhalten. Die Expression von CFP-Sam68 und YFP gab mit 0,7 % FRET-positiver Zellen ein minimales Signal, das als Hintergrundwert zu betrachten ist. Entgegen den Erwartungen konnte im Ansatz mit CFP-Sam68 und YFP-RasGAP-SH3 mit 3,7 % ein deutliches, wenn auch schwaches FRET-Signal detektiert werden, was darauf hindeutet, dass *in vivo* zwar eine Sam68-RasGAP-Wechselwirkung stattfinden kann, diese aber – zumindest in HEK293T-Zellen – sehr schwach ist. Das FRET-Signal für die Interaktion von Sam68 und Nck1 #2 lag mit 0,7 % auf dem Niveau des Hintergrunds, so dass diese SH3-Domäne trotz der gezeigten *in vitro*-Interaktion anscheinend kein *in vivo*-Binder ist. Für die

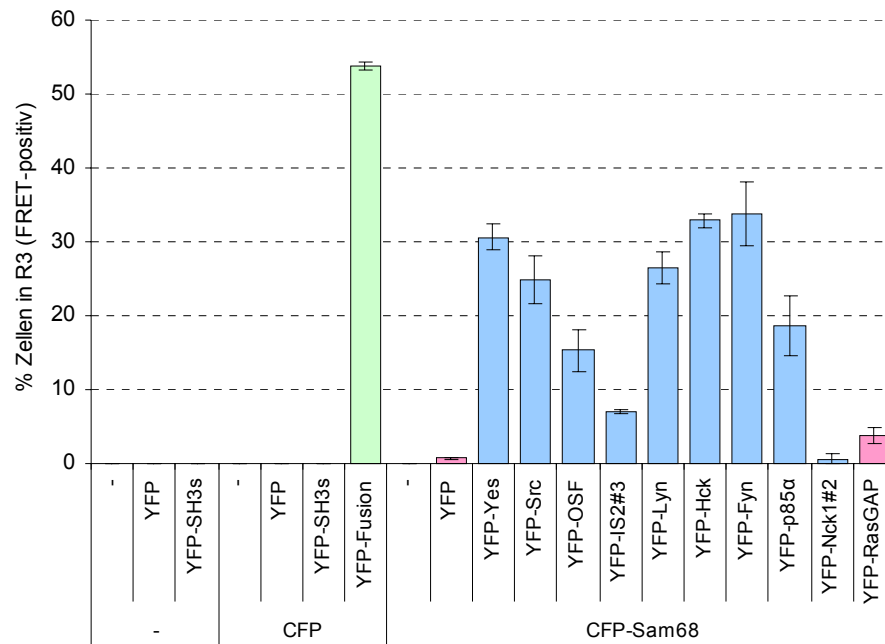


**Abb. 3.10 Durchfluscytometrische FRET-Analyse**

HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen fluoreszierenden Proteinen transfiziert und 48 h später durchfluscytometrisch bei Anregung mit dem 405 nm-Laser analysiert. In den Diagrammen ist für jede Zelle die Fluoreszenz-Intensität im 485/42-Filter (Signal von CFP, ggf. vergrößert durch YFP-Fluoreszenz aufgrund von FRET) gegen diejenige im 450/50-Filter (Signal nur von CFP) aufgetragen. Die anhand der Kontrollen definierten Regionen R2 und R3 markieren jeweils FRET-negative (rot) bzw. FRET-positive (grün) Zellen. Obere Reihe: FRET-Kontrollen, untere Reihe: FRET zwischen CFP-Sam68 und drei exemplarischen SH3-Domänen.

meisten SH3-Domänen, insb. die starken Bindungspartner der Src-Kinasen-Familie, wurde mit deutlich mehr als 20 % FRET-positiver Zellen die Interaktion eindeutig nachgewiesen. Die Ergebnisse der *in vivo*-Untersuchung korrespondieren also gut mit den *in vitro*-Daten. Für einen umfassenden Vergleich der Bindungsdaten aus den verschiedenen Testsystemen sei auf die Diskussion verwiesen (siehe 4.1.2).





**Abb. 3.11 Nachweis der *in vivo*-Interaktion von Sam68 mit SH3-Domänen mittels FRET-Analyse**  
HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen fluoreszierenden Proteinen transfiziert und 48 h später durchflusscytometrisch analysiert. Positiv-Kontrolle: CFP-YFP-Fusion (grün); Negativ-Kontrollen: YFP, YFP-RasGAP (rot); getestete SH3-Domänen (blau). Gezeigt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardfehler.

### 3.1.8 Zusammenfassung

Wie in diesem Abschnitt dargelegt, wurden mit Hilfe des Phagen-Display-Verfahrens unter Verwendung einer Bibliothek, die alle humanen SH3-Domänen beinhaltet, zahlreiche Interaktionspartner des humanen Sam68-Proteins identifiziert. Dies waren v. a. SH3-Domänen der Vertreter der Src-Kinasen-Familie (Yes, Src, Lyn, Fyn, Hck). Ein Grossteil dieser Binder wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben und bestätigt somit den erfolgreichen Ablauf des Bio-Pannings. Darüber hinaus wurden weitere SH3-Domänen identifiziert, die zuvor nicht mit Sam68 in Verbindung gebracht wurden (von Hck, dem Osteoclasten-stimulierenden Faktor (OSF), Intersectin 2 #3). Mit Hilfe eines Phagen-ELISAs wurden die Interaktionspartner als solche bestätigt und die relativen Bindungsaffinitäten bestimmt. Durch einen Pull-Down-Assay wurde gezeigt, dass die Binder auch mit posttranslational modifiziertem Sam68 aus eukaryotischen Zellen interagieren. Zum Nachweis der *in vivo*-Interaktion wurde ein durchflusscytometrisches Verfahren etabliert, welches Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen CFP-markiertem Sam68 und YFP-markierten SH3-Domänen detektiert. Die Interaktion der Kandidaten aus dem Panning bestätigte sich hier *in vivo* für alle SH3-Domänen ausser Nck1#2, wohingegen für RasGAP, das *in vitro* als Negativ-Kontrolle diente, eine schwache Wechselwirkung festgestellt werden konnte.



## **3.2 Beteiligung von Sam68-SH3-Interaktionen an der HIV-Replikation**

Wie in der Einleitung ausführlich dargelegt, spielt Sam68 eine wichtige Rolle im HI-viralen Replikationszyklus, obgleich seine genaue Funktion kontrovers diskutiert wird. In diesem Zusammenhang wurde bislang nicht untersucht, ob Interaktionen von Sam68 mit SH3-Domänen von Bedeutung sind.

Um diese Frage zu adressieren, wurden Sam68-Mutanten hergestellt, bei denen die SH3-Bindestellen inaktiviert sind. SH3-Bindestellen bestehen meist aus Prolin-reichen Sequenzen, im Falle von Sam68 kommen sieben Stück in Frage, die mit P0 bis P6 bezeichnet werden (vgl. Abb. 1.5, im Folgenden allgemein kurz Px genannt). Aufgrund der Eigenschaften von Prolin führen Mutationen dieser Aminosäure in Polypeptiden oft zu ausgeprägten strukturellen Veränderungen, welche sich negativ auf die Funktionalität des Proteins auswirken können. Im Falle von Sam68 enthalten die sieben Px-Motive insgesamt immerhin 32 Proline, weshalb ein vollständiger Austausch fragwürdig wäre. Stattdessen wurde zunächst untersucht, mit welchen dieser Px-Motive die in 3.1 identifizierten SH3-Domänen eine Interaktion eingehen (siehe 3.2.1). Anschliessend wurden die relevanten Px-Motive mit der Massgabe mutiert, die SH3-Interaktionen durch Einführung von möglichst wenig Aminosäureaustauschen vollständig zu unterbinden (siehe 3.2.2). Die auf Basis dieser Daten generierten Sam68- $\Delta$ Px-Mutanten wurden dann mit der im vorherigen Abschnitt beschriebenen FRET-Technik *in vivo* charakterisiert (siehe 3.2.3). Anschliessend wurde geprüft, ob die Überexpression der Mutanten einen Einfluss auf die HIV-Replikation hat (siehe 3.2.4) bzw. ob die Mutanten in der Lage sind, den Sam68 $\Delta$ C-vermittelten funktionellen Sam68-Knock-down (vgl. 1.3) zu komplementieren (siehe 3.2.5).

### **3.2.1 Identifizierung der SH3-Bindestellen in Sam68**

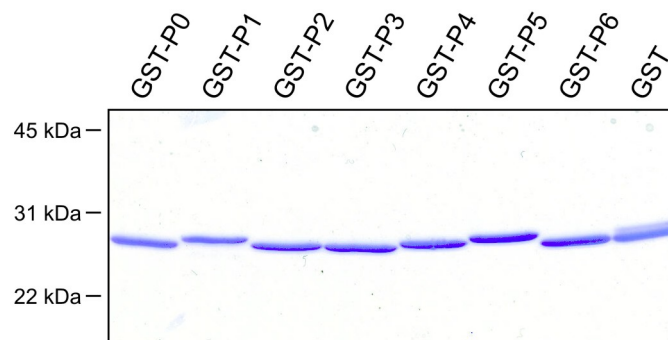
Bei initialen Experimenten mit jeweils separat mutierten Px-Motiven stellte sich heraus, dass die Inaktivierung von keinem einzelnen Motiv zum Verlust der Wechselwirkung mit den SH3-Domänen führte. Lediglich bei Mutation von P5 wurde manchmal eine Abnahme der Affinität beobachtet (Daten nicht gezeigt). Hieraus folgt, dass die getesteten SH3-Domänen jeweils mit mindestens zwei Px-Motiven interagieren können. Die Generierung von  $\Delta$ Px-Kombinationsmutanten schied aus, da  $2^7 = 128$  Varianten denkbar sind. Stattdessen wurden die Px-Motive als ca. 20 Aminosäuren lange Peptide (siehe Tabelle 3.2) als GST-Fusion produziert und affinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe 2.3.2). Die entsprechenden prokaryotischen Expressionskonstrukte (pGEX-Px) wurden durch direkte Ligation entsprechender Oligonucleotide in den GST-Expressionsvektor pGEX-KG hergestellt (siehe 5.2.3). Abb. 3.12 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse der sieben aufgereinigten Proteine. Wie

schon bei der Aufreinigung der GST-SH3-Domänen wurden je ca. 10 - 15 mg rekombinantes Protein aus 250 ml Ausgangskultur in hervorragender Reinheit erhalten.

**Tabelle 3.2 Oligopeptide mit den sieben PxxP-Motiven von Sam68**

Name	Sequenz	Typ	Position
P0	QTPSRQ <b>PPLPH</b> RSRGGGG	Klasse 2R	32 - 50
P1	ASPATQPP <b>PLLPP</b> SATGPD	PxxP-Consensus	57 - 75
P2	ATVGGPAPT <b>PLLPP</b> SATASV	PxxP-Consensus	76 - 95
P3	RGRGA <b>APPPPPV</b> PRGRGVG	PxxPxxP und PxxP-Consensus	289 - 305
P4	RGATVTRGV <b>PPPP</b> TVRGAP	Klasse 1R	325 - 343
P5	AGIQRI <b>PLPPPP</b> APETYEEY	PxxPPxxP und PxxP-Consensus	350 - 369
P6	GTRPSL <b>KAPPAR</b> PVKGAYR	Klasse 1K	418 - 436

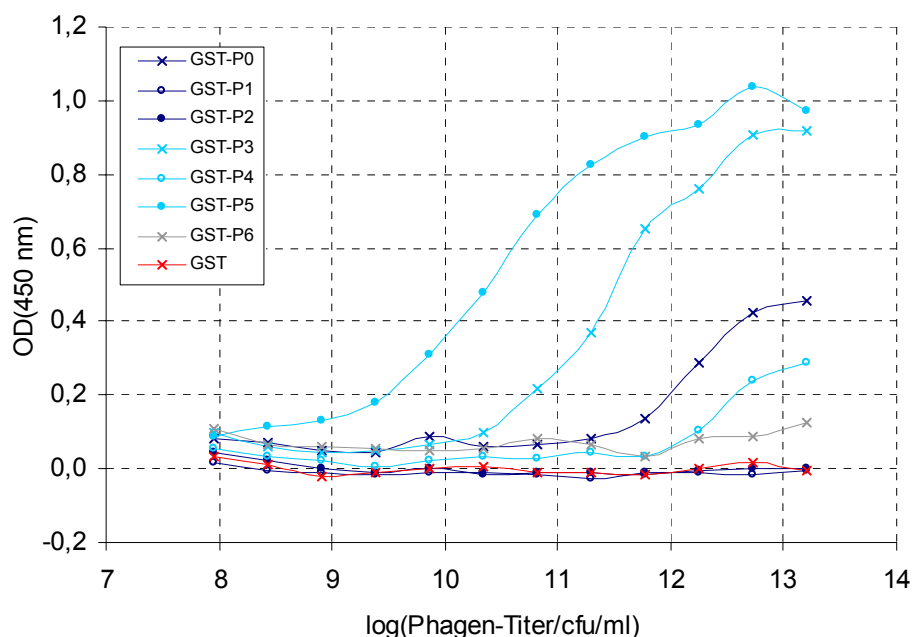
Die Proline und ggf. basischen AS der Kern-Consensus-Motive sind fett gedruckt.



**Abb. 3.12 SDS-PAGE/Coomassie-Analyse der aufgereinigten GST-Px-Proteine**

Die mit einem N-terminalen GST-Tag versehenen Px-Peptide von Sam68 (vgl. Tab. 3.2) wurden affinitätschromatographisch an GSH-Sepharose aufgereinigt. Pro Spur wurde 1 µg aus der 2. Elutionsfraktion auf das SDS-Gel aufgetragen und nach dem Lauf mit Coomassie gefärbt. Die Proteine haben eine Größe von ca. 28 kDa.

Die Wechselwirkung der in 3.1 identifizierten SH3-Domänen mit den GST-Px-Proteinen wurde mit Hilfe des Phagen-ELISAs untersucht, weil er ein einfaches und zuverlässiges Werkzeug darstellt. Dazu wurden die Wells einer Mikrotiterplatte mit je 1 µg der GST-Px-Proteine beschickt und der ELISA dann analog zu 3.1.5 mit Verdünnungsreihen aller SH3-Phagen durchgeführt. Abb. 3.13 zeigt exemplarisch die Bindungskurven des Yes-Phagen für alle sieben Peptide sowie GST als Negativ-Kontrolle, Tabelle 3.3 fasst die Ergebnisse qualitativ für alle SH3/Px-Kombinationen zusammen.



**Abb. 3.13 Phagen-ELISA-Analyse der Interaktion des Yes-Phagen mit den GST-Px-Proteinen**

Je 1 µg GST-P0 bis -P6 bzw. GST wurde an die Wells einer Mikrotiterplatte adsorbiert, bevor Verdünnungsreihen des Yes-SH3-Phagen zugegeben wurden. Nach gründlichem Waschen wurden gebundene Phagen mit einem α-M13-HRP-gekoppelten Antikörper und TMB-Substrat-Umsetzung detektiert.

**Tabelle 3.3 Interaktion der SH3-Domänen mit den Px-Peptiden von Sam68**

SH3-Domäne		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Sam68*
Src-Kinasen	Fyn				+		++		41
	Hck	++			++	+	++		31
	Lyn	+++			+++	++	+++		7,9
	Src	++			++	++	+++		6,0
	Yes	+			++	+	+++		5,5
Andere	IS2#3	+							59
	Nck1#2	+			+				31
	OSF	+			+				22
	p85α	++				+			13
Neg.-Kontrolle		RasGAP							

Die Affinitäten der Interaktionen sind qualitativ nach demjenigen Phagen-Titer, bei dem halb-maximale Bindung erreicht wurde, wie folgt eingeteilt:

'+++' < 10<sup>11</sup> cfu/ml; '++' = 10<sup>11</sup> bis 10<sup>12</sup> cfu/ml; '+' > 10<sup>12</sup> cfu/ml

\* Sam68: K<sub>d</sub>-Werte der Interaktion mit Volllänge-Sam68 in nM aus Abb. 3.5b.

Wie man den Daten der Tabelle entnehmen kann, fungieren nur die Motive P0, P3, P4 und P5 als SH3-Bindestellen, nicht jedoch P1, P2 und P6. Die stärksten Bindungen fanden sich wiederum bei den SH3-Domänen der Src-Kinasen, die untereinander ein recht ähnliches Bindeprofil mit nur wenigen Unterschieden aufwiesen. Bevorzugte Bindungsstelle ist das Motiv P5, was mit den Ergebnissen der Vorversuche korrespondiert, wo es bei Sam68-P5-Deletion zu einer Abnahme der SH3-Bindung kam (s. o.). Die anderen SH3-Domänen wiesen insgesamt schwächere Bindungen und ein deutlich anderes Bindeprofil als diejenigen

aus den Src-Kinasen auf: Alle getesteten Domänen interagierten mit P0, keine jedoch mit P5. P3 und P4 dienten in unterschiedlichem Ausmass als Bindungspartner. Zum Vergleich ist in Tabelle 3.3 auch die Affinität der SH3-Domänen für Volllänge-Sam68 angegeben (Daten aus Abb. 3.3). Zum Vergleich der Werte sei auf die Diskussion verwiesen (siehe 4.1).

### 3.2.2 Generierung von Sam68- $\Delta$ Px-Mutanten

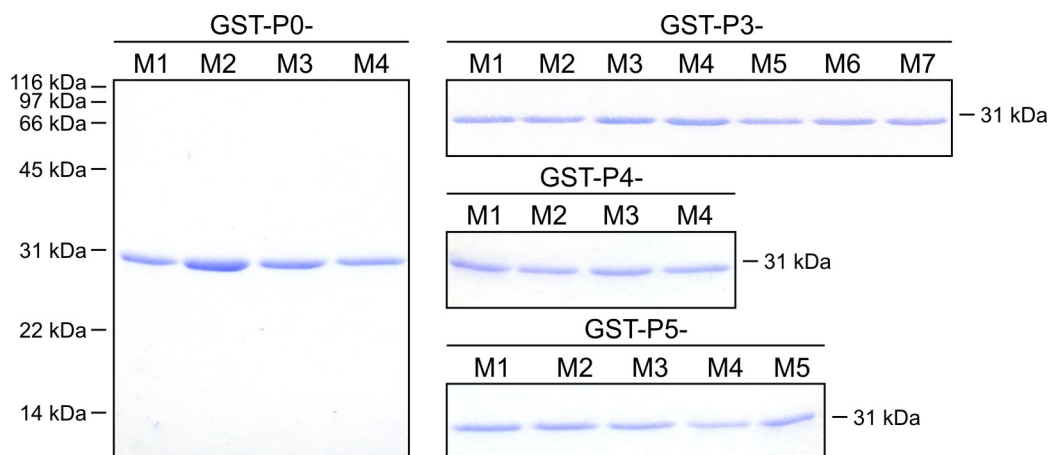
Von den vier oben identifizierten Peptiden mit SH3-Bindungsaktivität wurden Varianten hergestellt, bei denen einzelne Prolin-Reste durch Alanin ausgetauscht wurden. Die veränderten Sequenzen sind in Tab. 3.4 wiedergegeben.

**Tabelle 3.4 Varianten der Px-Peptide**

Motiv	P0	P3	P4	P5
Sequenz	QTPSRQ <b>F</b> P <b>L</b> P <b>H</b> SRGGGG	RGRGAA <b>P</b> P <b>P</b> P <b>V</b> FRGRGVG	RGATVTR <b>G</b> V <b>F</b> P <b>P</b> P <b>T</b> VRGAP	GIQRI <b>L</b> P <b>P</b> P <b>P</b> APETYEY
WT	<b>PxxPxR</b>	<b>PPxPPxP</b>	<b>RxxPxxP</b>	<b>PxPPPPxP</b>
M1	<b>PxxPx</b> A	<b>APxAPxP</b>	<b>AxxPxxP</b>	<b>AxPAPPxP</b>
M2	<b>AxxPxR</b>	<b>PAxPAxP</b>	<b>RxxAxxA</b>	<b>PxPPAPxA</b>
M3	<b>PxxAxR</b>	<b>PPxAPxA</b>	<b>RxxAxxP</b>	<b>PxAPPAPxP</b>
M4	<b>AxxAxR</b>	<b>AAxAPxP</b>	<b>AxxAxxP</b>	<b>AxAPAPxP</b>
M5		<b>APxAPxA</b>		<b>PxAPPxP</b>
M6		<b>AAxAPxA</b>		
M7		<b>AAxAAxA</b>		

Für jedes der vier Motive ist schematisch die Wildtyp-Peptid-Sequenz angegeben (WT), relevante Reste des Kern-Motivs sind grün hervorgehoben. Bei den Mutanten, bezeichnet mit M1 bis max. M7, ist jeweils nur das Kern-Motiv schematisch dargestellt, wobei die relevanten unveränderten Reste grün, die zu Alanin mutierten Reste rot hervorgehoben sind.

Die Expressionskonstrukte (siehe 5.2.3) wurden analog zu den Px-Peptiden hergestellt und die als GST-Px-My bezeichneten Varianten ebenso aufgereinigt. Abb. 3.14 zeigt die fertig aufgereinigten Proteine. Für jede SH3-Domäne wurde für die zugehörigen Peptide (siehe obige Tab. 3.3) ein entsprechender Phagen-ELISA mit den Px-My-Varianten durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind in Tab. 3.5 vereinfacht zusammengefasst.



**Abb. 3.14 SDS-PAGE/Coomassie-Analyse der aufgereinigten GST-Px-My-Proteine**

Die mit N-terminalem GST-Tag versehenen Px-My-Varianten (vgl. Tab. 3.4) wurden affinitätschromatographisch an GSH-Sepharose aufgereinigt. Pro Spur wurde 1 µg der gepoolten Elutionsfraktionen wie angegeben auf das SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Die Proteine haben eine Grösse von ca. 28 kDa.

**Tabelle 3.5 Identifizierung der Px-Mutationen, die zum Verlust aller SH3-Bindungen führen**

SH3-Domäne	P0					P3								P4					P5					
	W	M1	M2	M3	M4	W	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	W	M1	M2	M3	M4	W	M1	M2	M3	M4	M5
Yes	++	0	0	0	0	++	+	++	+	0	0	0	0	+	0	0	0	0	++	++	++	0	0	0
Src	++	0	++	++	0	++	++	++	++	+	+	+	0	++	+	0	0	0	++	++	++	0	0	0
Lyn	++	0	++	++	0	++	++	++	++	++	++	+	0	++	+	0	0	0	++	++	++	0	0	0
Hck	++	0	0	0	0	++	++	++	++	+	+	0	0	nd	nd	nd	nd	nd	++	0	0	0	0	0
Fyn	nd	nd	nd	nd	nd	++	0	0	0	0	0	0	0	nd	nd	nd	nd	nd	++	++	++	0	0	0
OSF	++	0	0	0	0	++	+	+	+	+	0	0	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IS2#3	++	0	0	0	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
p85α	++	0	0	0	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	0	0	0	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Optimal	M1= PxxPx <b>A</b>					M7 = <b>AAx</b> <b>AAx</b> <b>A</b>								M3 = Rxx <b>A</b> xxP					M5 = P <b>x</b> <b>A</b> PP <b>Px</b> P					

'++' = starke Bindung; '+' schwache Bindung, '0' = keine Bindung nachweisbar

W = Wildtyp, My = Nr. der Mutante, nd = nicht durchgeführt

In der letzten Zeile ist jeweils die optimale Mutante angegeben, die mit möglichst wenigen Mutationen keine Bindung mehr an die SH3-Domänen aufweist; die Mutationen zu Alanin sind in der schematischen Sequenz rot hervorgehoben.

Wie man den Daten aus Tabelle 3.5 entnehmen kann, genügt es zur vollständigen Inaktivierung des P0-Motivs, das C-terminal vom PxxP-Motiv gelegene Arginin zu mutieren. Die Zerstörung der P3-Bindestelle erfordert hingegen die Mutation aller fünf Proline dieses Motivs, während zur Zerstörung von P4 nur das erste Prolin ausgetauscht werden muss. Bei P5 zeigte sich, dass nur das mittlere der drei ineinander verwobenen PxxP-Motive die SH3-Bindung vermittelt, wobei auch hier die Mutation des ersten Prolins hinreichend zur Inaktivierung der Bindestelle ist.

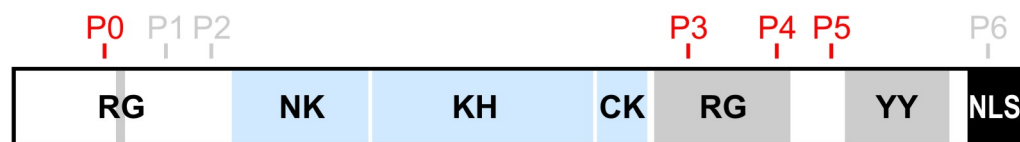
Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für die Folgenden Studien eukaryotische Sam68-Expressionskonstrukte hergestellt, bei denen jeweils eines der Motive nach dem Schema der in Tabelle 3.5 unter "optimal" angegebenen Sequenz mutiert wurde (Sam68ΔP0, Sam68ΔP3, Sam68ΔP4, Sam68ΔP5) sowie ein Konstrukt, bei dem alle vier Motive gleichzeitig verändert

wurden (Sam68 $\Delta$ P0345). Die Konstrukte wurden für die FRET-Analysen als CFP-Fusionsproteine in den Vektor pECFP-C1 kloniert, für die Untersuchungen im viralen Kontext in den Vektor pcDNA3 (siehe 5.2.3).

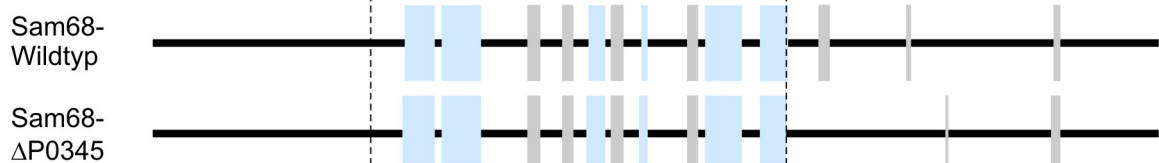
Die 3D-Struktur von Sam68 ist bislang nicht publiziert worden, und es existieren lediglich für die zentrale KH-Domäne Strukturdaten von homologen Domänen. Die Durchführung einer Sekundärstrukturvorhersage mit dem Programm JPred [170] ergab, dass höchstwahrscheinlich auch nur diese Region mit ihren flankierenden Bereichen stabile Sekundärstrukturen ausbildet, während der N- und C-Terminus unstrukturiert sind (Abb. 3.15b). Eine Analyse der Sam68-Sequenz mit dem Programm IUPred [171] ergab, dass diese Regionen intrinsisch unstrukturiert sind (Abb. 3.15c) – eine Eigenschaft, die man häufig bei Signaltransduktionsproteinen findet [172].

Die Einführung der Mutationen in Sam68 $\Delta$ Px hatte laut JPred keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des zentralen Bereichs, sondern führte lediglich in der Umgebung von P3 und P4 zum Verlust von wenige Aminosäuren umfassenden Regionen mit gestreckter Konformation. Es ist also zu erwarten, dass die eingeführten Veränderungen keine anderen Funktionen (insb. RNA-Bindung und Kernlokalisierung) ausser der SH3-Bindung beeinträchtigen.

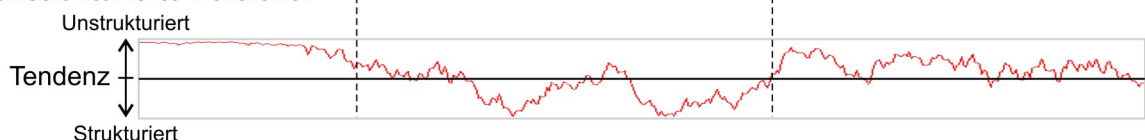
**a) Domänen-Struktur:**



**b) Sekundärstrukturelemente:**



**c) Unstrukturierte Bereiche:**



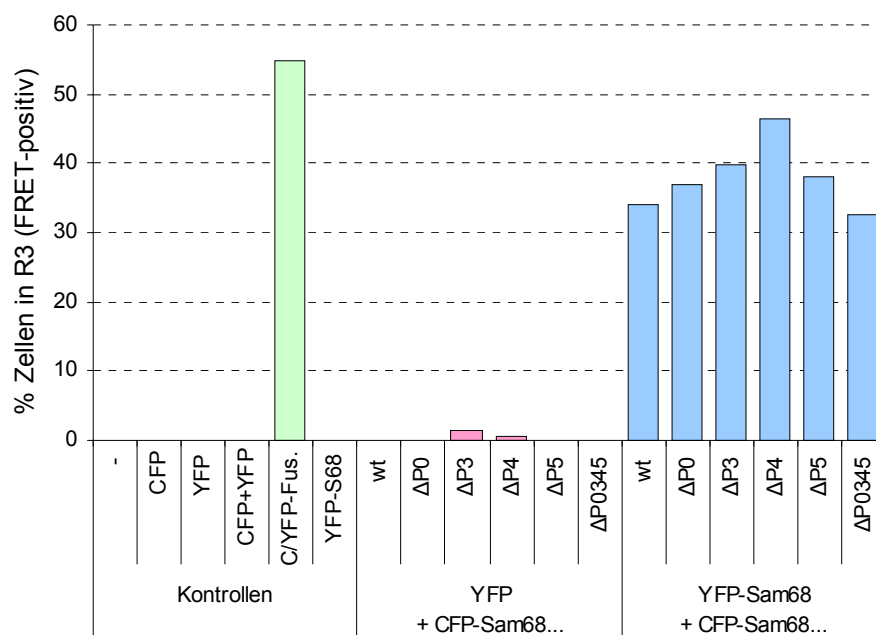
**Abb. 3.15 Strukturvorhersagen für Sam68 bzw. Sam68 $\Delta$ P0345**

**a)** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Sam68. Die Position der Px-Motive ist oberhalb markiert, SH3-bindende Px sind rot, die anderen grau markiert. **b)** Sekundärstrukturvorhersage für Wildtyp-Sam68 und Sam68 $\Delta$ P0345 mit JPred, blaue Balken:  $\alpha$ -helikale Konformation, graue Balken: gestreckte Konformation. **c)** Vorhersage intrinsisch unstrukturierter Bereich mit IUPred.

Nur die zentrale KH-Domäne von Sam68 mit ihren flankierenden Bereichen weist nennenswerte Strukturmerkmale auf, der Rest des Proteins scheint unstrukturiert zu sein.

### 3.2.3 Charakterisierung der Sam68- $\Delta$ Px-Mutanten mittels FRET

Mit der in Abschnitt 3.1.7 beschriebenen FRET-Technik wurden die Sam68-Mutanten *in vivo* charakterisiert. Um zu überprüfen, ob die Mutanten einen generellen Defekt aufweisen, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass Sam68 über seine KH-Domäne oligomerisiert [67]. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit YFP-Sam68 und CFP-Sam68 oder den CFP-Sam68 $\Delta$ Px-Mutanten transfiziert und 48 h später durchflusscytometrisch analysiert (siehe Abb. 3.16). Wie sich herausstellte, konnte zwischen YFP-Sam68 und CFP-Sam68 FRET detektiert werden, was die Beobachtung von CHEN et al. *in vivo* bestätigt. Darüber hinaus kam es in allen Ansätzen mit den Sam68 $\Delta$ Px-Mutanten ebenfalls zu einem starken FRET mit YFP-Sam68. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die Struktur von Sam68 insb. im Bereich der KH-Domäne durch die eingeführten Mutationen nicht negativ verändert hat, so dass die Fähigkeit zur Oligomerisierung nicht beeinträchtigt wurde. Über weitere Funktionen von Sam68, wie die RNA-Bindungsaktivität, die Interaktionen mit SH2-Domänen etc., erhält man aus dem Versuch natürlich keine Informationen.

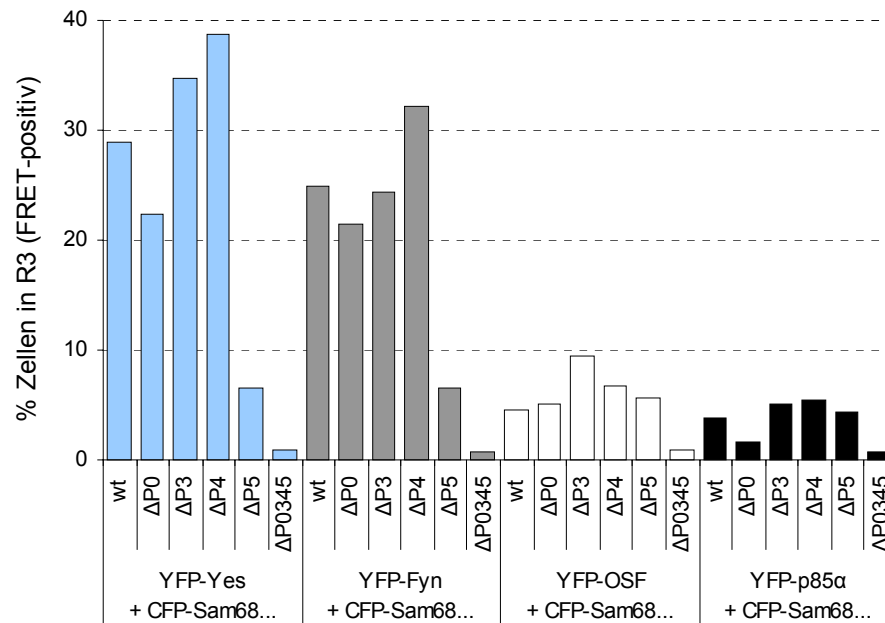


**Abb. 3.16 FRET-Analyse der Interaktion von YFP-Sam68 mit den Sam68- $\Delta$ PX-Mutanten**

HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen fluoreszierenden Proteinen transfiziert und 48 h später durchflusscytometrisch analysiert. Untersucht wurde die Interaktion von YFP (rote Balken, Negativ-Kontrollen) oder YFP-Sam68 (blaue Balken) mit CFP-Sam68 und CFP-Sam68 $\Delta$ Px. Positiv-Kontrolle: CFP-YFP-Fusionsprotein (grüner Balken).

Als Nächstes wurde analysiert, ob die eingeführten Sam68 $\Delta$ Px-Mutationen wie vorhergesagt zu einem Verlust der Interaktion mit den SH3-Domänen führen. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit den CFP-Sam68 $\Delta$ Px-Varianten und YFP-SH3-Domänen cotransfiziert und 48 h später das FRET-Signal gemessen (siehe Abb. 3.17). Untersucht wurden nur zwei

repräsentative SH3-Domänen der Src-Kinase-Familie (Yes und Fyn) sowie zwei der anderen SH3-Binder (OSF und p85 $\alpha$ ).



**Abb. 3.17 FRET-Analyse der Interaktion der CFP-Sam68-Mutanten mit SH3-Domänen**

HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen fluoreszierenden Proteinen transfiziert und 48 h später durchflusscytometrisch analysiert. Die zugehörigen Kontrollen sind in Abb. 3.16 gezeigt – die Messungen wurden parallel durchgeführt. Die Interaktion mit Sam68 und allen fünf Sam68-Mutanten wurde für vier repräsentative SH3-Domänen analysiert: Yes (blaue Balken), Fyn (graue Balken), OSF (weisse Balken), p85 $\alpha$  (schwarze Balken).

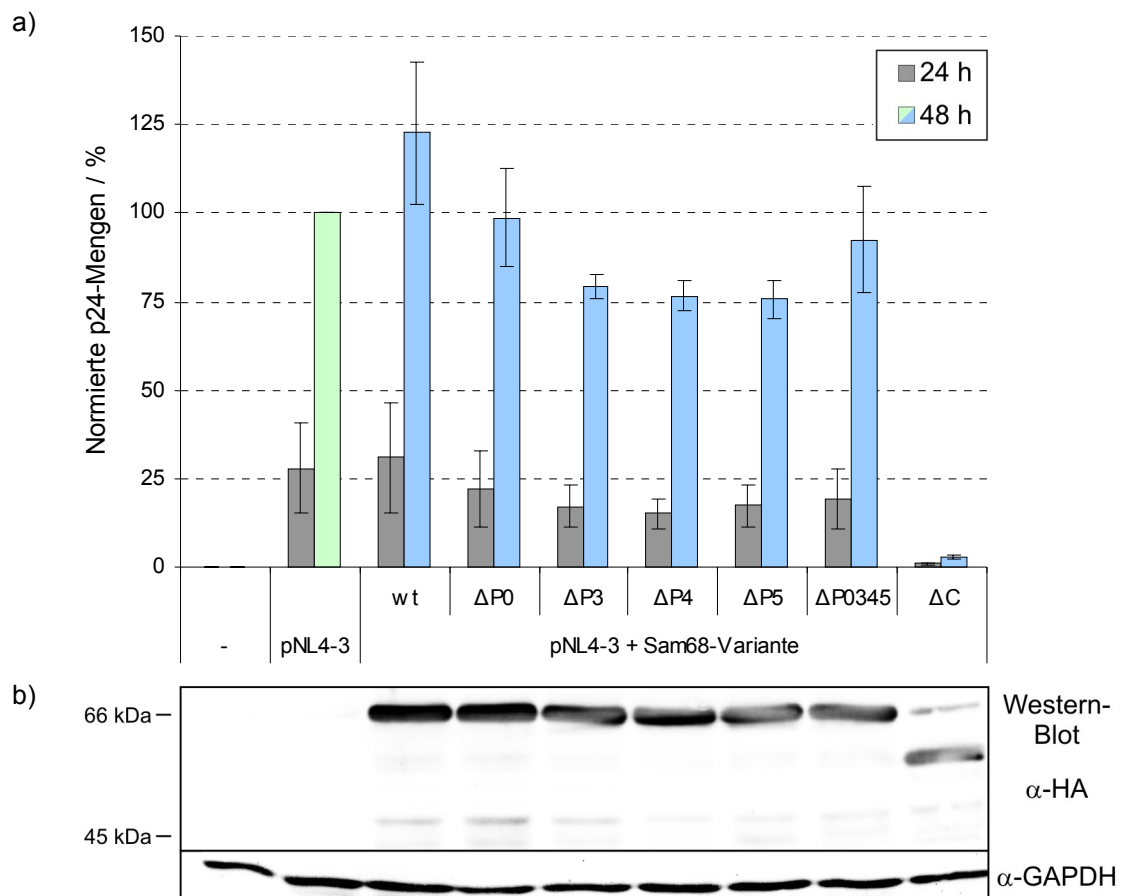
Wie man dem Diagramm entnehmen kann, nahm bei den SH3-Domänen von Yes und Fyn erwartungsgemäss nur die Bindung an Sam68 $\Delta$ P5, bei p85 $\alpha$  nur an Sam68 $\Delta$ P0 deutlich ab. Die Sam68 $\Delta$ Px-Einzelmutationen hatten keine Auswirkungen auf die Bindung an die OSF-SH3-Domäne. Dies bestätigt die Feststellung der *in vitro*-Analysen, dass die SH3-Domänen jeweils mit unterschiedlicher Präferenz an mehrere Px-Motive binden. Dementsprechend führt die Inaktivierung aller vier relevanten Px-Motive bei sämtlichen getesteten SH3-Domänen zu einer Reduktion der Interaktionsstärke fast bis auf das Hintergrundniveau. Sam68 $\Delta$ P0345 geht also keine Wechselwirkungen mehr mit den getesteten SH3-Domänen ein.

### 3.2.4 Einfluss der Überexpression von Sam68 $\Delta$ Px auf die HIV-Replikation

REDDY *et al.* beschrieben 1999 eine Sam68-Mutante, die einen dominant-negativen Einfluss auf die HIV-Replikation bzw. auf ein Rev-abhängiges Reportersystem hatte [124]. Bei dieser Mutante (Sam68 $\Delta$ C) war der C-Terminus mit der NLS deletiert, was zu einer Fehllokalisation im Cytoplasma und damit zu einer Beeinträchtigung der Funktion von Sam68 im Rahmen der HIV-Replikation führte.



In Analogie zu diesen Experimenten sollte im ersten Schritt untersucht werden, ob die generierten Sam68 $\Delta$ Px-Mutanten ebenfalls einen trans-dominanten Phänotyp wie die Sam68 $\Delta$ C-Mutante aufweisen. Dazu wurden diese Mutanten im Rahmen eines HIV-Replikations-Assays (siehe 2.4.6) zusammen mit dem proviralen Plasmid pNL4-3 in einem molaren Verhältnis von 20 : 1 in HEK293T-Zellen cotransfiziert. Nach 24 h und 48 h wurden Aliquots des Kulturüberstandes entnommen und die Menge produzierter Viruspartikel mittels eines p24-ELISAs quantifiziert (siehe 2.3.8). Der HIV-Replikations-Assay bietet den Vorteil, dass mit der Messung alle Schritte der HIV-Replikation auf einmal erfasst werden, beginnend mit dem Einsetzen der Transkription über den RNA-Metabolismus und die Translation bis hin zur Virusfreisetzung. Es spielt daher zunächst keine Rolle, welcher Schritt ggf. durch die Mutanten beeinträchtigt wird, was angesichts der umstrittenen Detail-Funktionen von Sam68 von Vorteil ist.



**Abb. 3.18 Einfluss der Überexpression der Sam68 $\Delta$ Px-Mutanten auf die HIV-Replikation**

HEK293T-Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ g pNL4-3 und den Sam68-Varianten (wt = pcSam68,  $\Delta$ Px = pcSam68 $\Delta$ Px,  $\Delta$ C = pcSam68 $\Delta$ C) im molaren Verhältnis 1 : 20 cotransfiziert; die DNA-Mengen wurden mit pcDNA3.1 normalisiert. **a)** 24 h und 48 h nach der Transfektion wurden Aliquots der Kulturüberstände abgenommen und der Virusgehalt mit einem p24-ELISA bestimmt. Gezeigt sind die auf pNL4-3 alleine (grün) normierten p24-Mengen von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). **b)** Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und je 50  $\mu$ g Gesamtprotein mittels einer Western-Blot-Analyse mit einem  $\alpha$ -HA-Antikörper auf Produktion der Sam68-Varianten hin untersucht. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH.

Wie man Abb. 3.18 entnehmen kann, führte die Überexpression von Wildtyp-Sam68 zu einer leichten Zunahme der Partikelproduktion verglichen mit dem Wert, der für Zellen erhalten wurde, die nur mit pNL4-3 transfiziert worden waren. Bei Überexpression von Sam68 $\Delta$ P3, - $\Delta$ P4 und - $\Delta$ P5 ist zwar eine leichte Abnahme zu beobachten, aber weil dieser Effekt bei der Kombinationsmutante Sam68 $\Delta$ P0345 nicht auftritt, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um experimentelle Schwankungen handelt. Ein deutlich ausgeprägter Effekt ist nur bei der als Kontrolle mitgeführten Sam68 $\Delta$ C-Mutante zu sehen, die wie erwartet zu einer drastischen Verminderung der Virus-Partikelproduktion führte. Insgesamt lässt sich also feststellen, dass die Expression der Sam68 $\Delta$ Px-Mutanten keinen Einfluss auf die HIV-Replikation hatte. Vergleichbare Ergebnisse wurden in zwei weiteren Zelllinien (HEK293, HeLa) erhalten (Daten nicht gezeigt).

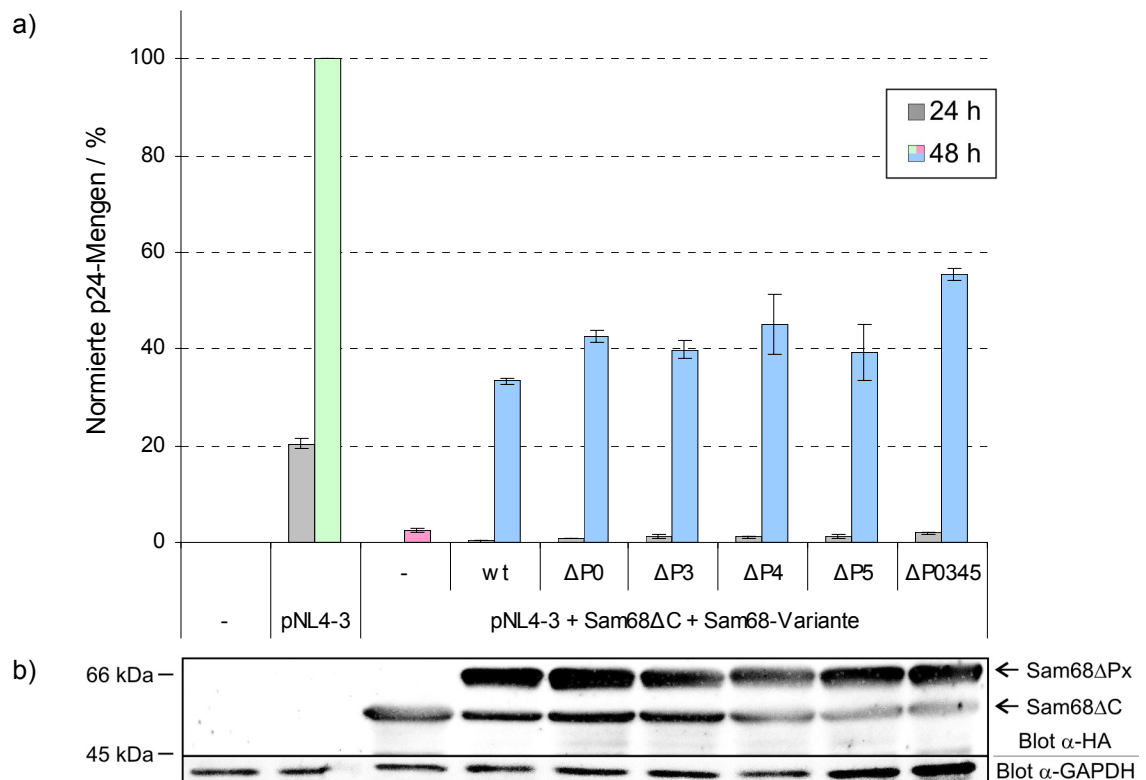
Dieses Ergebnis lässt jedoch offen, ob die Sam68 $\Delta$ Px-Mutanten keine Wirkung auf die HIV-Partikelproduktion hatten, weil sie einen generellen Funktionsdefekt aufweisen, oder ob SH3-Wechselwirkungen in diesem Kontext irrelevant sind.

### **3.2.5 Komplementierung des Sam68 $\Delta$ C-vermittelten Effekts**

Um zu klären, ob die Sam68 $\Delta$ Px-Varianten einen generellen Funktionsdefekt aufweisen, wurde überprüft, ob sie in der Lage sind, den durch die Sam68 $\Delta$ C-Mutante vermittelten dominant-negativen Effekt auf die HIV-Partikelproduktion zu komplementieren.

Dazu wurden HEK293T-Zellen wie im vorhergehenden Versuch mit dem proviralen Plasmid pNL4-3, einem 20-fachen molaren Überschuss des Sam68 $\Delta$ C-Expressionsplasmids sowie den verschiedenen Sam68 $\Delta$ Px-Varianten bzw. dem Wildtyp-Konstrukt cotransfiziert und analog analysiert.

Wie in Abb. 3.19 zu sehen ist, führte die Überexpression der Sam68 $\Delta$ C-Variante (roter Balken) zu einer drastischen Abnahme der Viruspartikelproduktion im Vergleich zu dem Ansatz, in dem nur das provirale Plasmid enthalten war (grüner Balken). Durch die Coexpression von Wildtyp-Sam68 konnte dieser Effekt teilweise wieder aufgehoben werden. Auch die Sam68 $\Delta$ Px-Varianten (blaue Balken) waren in der Lage, die Reduktion in vergleichbarem Ausmass zu komplementieren. Das spricht dafür, dass die Varianten funktionsfähig sind und Wechselwirkungen von Sam68 mit SH3-Domänen somit keine Rolle während der HIV-Replikation spielen.



**Abb. 3.19 Komplementierung des Sam68ΔC-Effekts durch die Sam68ΔPx-Mutanten**

HEK293T-Zellen wurden mit je 0,25 µg pNL4-3 sowie pcSam68ΔC und den Sam68-Varianten (wt = pcSam68, ΔPx = pcSam68ΔPx) im molaren Verhältnis 1 : 20 : 20 cotransfiziert; die DNA-Mengen wurden mit pcDNA3.1 normalisiert. **a)** 24 h und 48 h nach der Transfektion wurden Aliquots der Kulturüberstände abgenommen und der Virusgehalt mit einem p24-ELISA bestimmt. Gezeigt sind die auf pNL4-3 alleine (grün) normierten p24-Mengen von drei parallelen Experimenten (Mittelwert ± Standardfehler). **b)** Nach 48 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und je 50 µg Gesamtprotein mittels einer Western-Blot-Analyse mit einem α-HA-Antikörper auf Produktion der Sam68-Varianten hin untersucht. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH.

### 3.2.6 Zusammenfassung

Wie in diesem Abschnitt dargelegt, wurden diejenigen der sieben Prolin-reichen Motive in Sam68 identifiziert, die als Bindestellen für SH3-Domänen dienen. Dabei stellte sich heraus, dass nur die vier Motive P0, P3, P4 und P5 SH3-Bindestellen darstellen, nicht jedoch die drei Motive P1, P2 und P6. Die SH3-Domänen weisen dabei unterschiedliche Präferenzen für bestimmte Motive auf. Durch Untersuchung mutierter Px-Motive konnten einige Aminosäuren identifiziert werden, die für die Bindung essentiell sind. Basierend auf diesen Daten wurden fünf Sam68-Varianten generiert, bei denen die vier relevanten Px-Motive durch Mutation möglichst weniger Aminosäuren einzeln (Sam68ΔPx) oder alle in Kombination (Sam68ΔP0345) inaktiviert wurden. Mit Hilfe der FRET-Analyse konnte bestätigt werden, dass die identifizierten Motive *in vivo* für die SH3-Bindung verantwortlich sind. Darüber hinaus waren alle Sam68-Varianten noch in der Lage, mit dem Wildtyp-Protein zu oligomerisieren, was darauf hindeutet, dass die Funktion der zentralen KH-Domäne durch die Mutationen nicht beeinträchtigt wurde. Die Expression der Sam68ΔPx-Varianten hatte

keinen Einfluss auf die HIV-Replikation. Darüber hinaus waren alle Mutanten genau wie Wildtyp-Sam68 in der Lage, den trans-dominanten Effekt der Sam68 $\Delta$ C-Mutante auf die HIV-Replikation zu komplementieren. Daraus folgt, dass die generierten Mutanten im Rahmen der HIV-Replikation noch vollständig funktionsfähig sind. Die Sam68-SH3-Wechselwirkungen scheinen somit keine Rolle für die HIV-Replikation zu spielen.

### 3.3 Entwicklung eines SH3-basierten HIV-Inhibitors

Die in Abschnitt 3.2 dargestellten Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass Sam68 seine Funktionen im Rahmen der HIV-Replikation unabhängig von der Interaktion mit SH3-Domänen wahrnimmt. Dennoch sollte das Ziel verfolgt werden, ausgehend von einer SH3-Domäne einen HIV-Inhibitor zu entwickeln, der gegen Sam68 und damit gegen ein zelluläres Protein gerichtet ist. Dadurch wird eine schnelle Resistenzentwicklung aufgrund der hohen Variabilität des HI-Virus ausgeschlossen.

Es sollten zwei potentielle Wirkmechanismen getestet werden:

- 1) Durch die Bindung einer isolierten SH3-Domäne wird Sam68 ggf. aus sterischen Gründen an der Interaktion mit weiteren Faktoren gehindert, die funktionell relevant sind. Dadurch ändert sich die Zusammensetzung des Sam68-Multiproteinkomplexes, was die HIV-Replikation u. U. negativ beeinflusst. Es wäre von Vorteil eine SH3-Domäne einzusetzen, die mit möglichst hoher Affinität, idealerweise sogar irreversibel, an Sam68 bindet.
- 2) Durch den Einsatz einer SH3-Domäne, welche ggf. die subzelluläre Lokalisation von Sam68 modifiziert, steht dieses nicht mehr am richtigen Ort zur Verfügung. Funktionell entspricht das dem Einsatz der Sam68 $\Delta$ C-Mutante, die das endogene Volllänge-Sam68 im Cytoplasma zurückhält. Der Effekt lässt sich möglicherweise durch Anfügen einer Kernexportsequenz (NES = *nuclear export sequence*) an die wiederum möglichst hoch-affine SH3-Domäne erreichen.

Beide Strategien wurden parallel verfolgt. Dazu wurde zunächst, ausgehend vom besten Sam68-Binder, der Yes-SH3-Domäne, eine Affinitätssteigerung durchgeführt. Mit einer Kombination aus Orts-gerichteter Zufalls-Mutagenese der SH3-Domäne und Phagen-Display-Selektion wurde eine Variante, Yes-opt genannt, gewonnen, die mit knapp 70-fach höherer Affinität an Sam68 bindet (siehe 3.3.1). Diese Variante wurde ebenfalls analog zu den im Phagen-Display identifizierten SH3-Domänen detailliert charakterisiert (siehe 3.3.2). Anschliessend wurde fluoreszenzmikroskopisch ermittelt, welche Lokalisation die Wildtyp-Yes- und die Yes-opt-SH3-Domänen ohne und mit einer NES aufweisen (siehe 3.3.4). Abschliessend wurde untersucht, ob Wildtyp-Yes oder Yes-opt, jeweils ohne oder mit NES-Sequenz, als Inhibitoren der HIV-Replikation wirken (siehe 3.3.4 bzw. 3.3.5).

### 3.3.1 Affinitätssteigerung der Yes-SH3-Domäne

Das Verfahren zur Affinitätssteigerung der Yes-SH3-Domäne wurde von Maria KELLNER im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt [173]. Die Vorgehensweise orientierte sich an der Arbeit von HIIPAKKA *et al.* [174]. Das Konzept und die Ergebnisse werden im Folgenden kurz zusammengefasst:

Die sechs variablen Aminosäuren des spezifitätsvermittelnden RT-loops der SH3-Domäne (siehe Abb. 1.2) von Yes (EARTTE) wurden mit einem Oligonucleotid, welches die degenerierte Sequenz (NNK)<sub>6</sub> enthielt, mittels PCR randomisiert. Die Verwendung des Codons NNK (K = G oder T) erlaubt zwar das Vorkommen aller 20 Aminosäuren, verhindert aber in einem *supE*-Bakterienstamm mit TAG-Suppressor-tRNA das Auftreten eines vorzeitigen Stop-Codons. Die randomisierten Sequenzen wurden dann in das Phagmid pCANTAB eingebracht, welches die Expression als Fusion mit dem nur in ca. fünf Kopien vorliegenden Oberflächenprotein p3 des M13-Phagen erlaubt (monovalentes Display). Dadurch wird eine stringenter Selektion möglich, weil der Aviditätseffekt nicht so ausgeprägt ist wie bei Verwendung von p8. Theoretisch sind  $6,4 \cdot 10^7$  Hexapeptid-Varianten möglich. Die Phagen-Bibliothek, die aus dem Phagmid-Pool generiert werden konnte, hatte einen Umfang von ca.  $1 \cdot 10^7$  Varianten und wies bei Kontrollsequenzierungen eine hohe Diversität auf. Rechnerisch ergibt sich eine Vollständigkeit von ca. 14 %, die tatsächlich allerdings deutlich niedriger ausfällt, weil aufgrund des degenerierten genetischen Codes nicht alle Varianten mit gleicher Wahrscheinlichkeit vertreten sind. Dennoch enthielt die Bibliothek Varianten in genügend grosser Zahl für das Phagen-Display-Selektionsverfahren. In fünf aufeinanderfolgenden Bio-Panning-Runden mit rekombinant hergestelltem Sam68 als Zielprotein wurden Phagen selektioniert, die mit höherer Affinität an Sam68 banden. Die Sequenzierung der Phagmide aus infizierten Bakterien ergab, dass sechs Varianten besonders häufig vertreten waren. Diese wurden in einem Phagen-ELISA analysiert und wiesen bis zu 67-fach höhere Affinitäten gegenüber Sam68 auf als die Wildtyp-Yes-SH3-Domäne. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

**Tabelle 3.6 Hoch-affine Varianten der Yes-SH3-Domäne**

RT-loop-Sequenz	Häufigkeit im Bio-Panning	Affinität
SSQYGP	15	67 x
KAKFWF	4	55 x
QSRYFV	10	38 x
ESRYWQ	6	30 x
QAFICE	4	24 x
VSSYGL	3	20 x

Die sechs Kandidaten wurden mittels Bio-Panning gegen Sam68 aus einer Phagen-Bibliothek von Yes-Varianten, bei denen die sechs Aminosäuren des RT-loops (Wildtyp: EARTTE) randomisiert waren, selektioniert. Die Affinitäten wurden mit Hilfe eines Phagen-ELISAs bestimmt und sind relativ zum Yes-Wildtyp (= 1 x) angegeben. (Aus KELLNER, 2007 [173].)

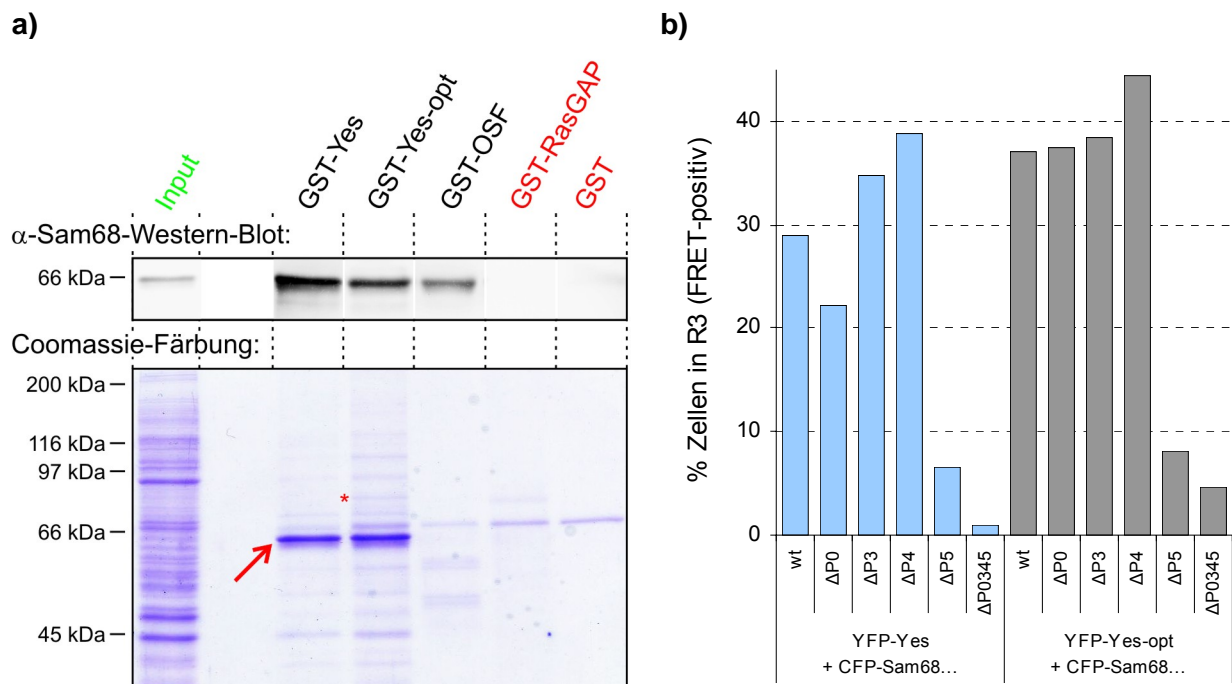
Der beste Kandidat mit der optimierten RT-loop-Sequenz SSQYGP wurde für die folgenden Studien im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählt und wird fortan als »Yes-opt« bezeichnet.

### **3.3.2 Charakterisierung von Yes-opt**

Die neu generierte Variante Yes-opt wurde analog zu den anderen SH3-Domänen bzgl. der Interaktion mit Sam68 *in vitro* und *in vivo* charakterisiert.

Rekombinant hergestelltes GST-Yes-opt (siehe Abb. 3.7, letzte Spur) sowie zum direkten Vergleich GST-Yes, GST-OSF als ein weiterer Sam68-Binder und die Negativ-Kontrollen GST-RasGAP und GST wurden an magnetische Beads gekoppelt, die für einen Pull-Down-Assay unter denselben Bedingungen wie in 3.1.6 beschrieben eingesetzt wurden, um Sam68 aus einem HEK293T-Zelllysats zu präzipitieren. Wie man Abb. 3.20a entnehmen kann, bestätigte der Western-Blot gegen Sam68 die GST-Yes-opt-Sam68-Interaktion *in vitro*. GST-Yes-opt und GST-Yes wiesen erwartungsgemäss eine wesentlich stärkere Bindung an Sam68 auf als das zum Vergleich mitgeführte GST-OSF.

Um einen Eindruck davon zu bekommen, ob sich die Spezifität der SH3-Domäne durch die Affinitätssteigerung verändert hatte, wurde ein analoger Pull-Down-Assay durchgeführt, bei dem allerdings das Gel nach der PAGE direkt mit Coomassie gefärbt wurde (Abb. 3.20a, unterer Bereich). Wie man sieht, trat bei den Ansätzen mit GST-Yes und GST-Yes-opt jeweils eine prominente Bande auf, die Sam68 zuzuordnen ist (mit rotem Pfeil markiert). Darüber hinaus wurden zahlreiche weitere Banden detektiert, wobei das Gesamtmuster – abgesehen von den Intensitäten – weitgehend übereinstimmte. Es sei angemerkt, dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob es sich bei den detektierten Proteinen um direkte Liganden der SH3-Domänen handelt oder, was wahrscheinlicher ist, um Proteine, die Teil des Sam68-Multiproteinkomplexes sind. Lediglich eine Bande tritt bei GST-Yes-opt zusätzlich auf (mit rotem Stern markiert), was wohl auf eine direkte Interaktion zurückzuführen sein dürfte. Dass das Muster bei GST-OSF nicht erkennbar ist, lässt sich darauf zurückführen, dass nur wenig Sam68 gebunden wurde, das aufgrund der niedrigen Sensitivität der Färbung ebenfalls nicht sichtbar ist. Die Banden in dieser Spur sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Sam68-unabhängige Wechselwirkungen von OSF zurückzuführen. Bei den Negativ-Kontrollen ist nur das zum Blocken verwendete BSA sichtbar. Die Bindungsspezifität von Yes-opt und Yes scheint also annähernd gleich zu sein.



**Abb. 3.20 Interaktion von Yes-opt mit Sam68 *in vitro* und *in vivo***

**a)** Pull-Down-Assay. 10 µg der angegebenen GST-Proteine wurden an magnetischen Beads immobilisiert, die dann mit 2,5 mg HEK293T-Zelllysats  $\ddot{U}$ nkubiert wurden. Nach dem Waschen wurden gebundene Proteine mit Probenpuffer eluiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und entweder spezifisch Sam68 im Western-Blot (oberer Bereich) oder alle Proteine in der Coomassie-Färbung (unterer Bereich) visualisiert. Input: 50 µg Gesamtprotein des HEK293T-Lysats.

**b)** FRET-Analyse. HEK293T-Zellen wurden mit pEYFP-Yes-opt und den angegebenen Sam68-Mutanten cotransfiziert. 48 h später wurden durchflusscytometrisch FRET-positive Zellen quantifiziert (graue Balken, zu den Details der Messung siehe 3.1.7). Zum direkten Vergleich sind die Daten für YFP-Yes aus Abb. 3.17 noch einmal dargestellt (blaue Balken).

Zur *in vivo*-Analyse wurde wieder die FRET-Technik aus 3.1.7 herangezogen. HEK293T-Zellen wurden mit pECFP-Sam68 bzw. den fünf pECFP-Sam68 $\Delta$ Px-Konstrukten und pEYFP-Yes-opt im Verhältnis 1:1 cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen durchflusscytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.20b dargestellt - zum direkten Vergleich neben den Daten für YFP-Yes aus Abb. 3.17. Wie man sieht, ähnelt das Bindungsprofil von Yes-opt wiederum demjenigen von Wildtyp-Yes. Allerdings wurden mit Yes-opt durchwegs mehr FRET-positive Zellen detektiert, was die Steigerung der Affinität bestätigt. Interessant ist, dass auch die Sam68 $\Delta$ P0345-Mutante ein deutliches – wenn auch schwaches – Signal lieferte.

Abschliessend wurde überprüft, ob sich durch die Affinitätssteigerung die Präferenz von Yes-opt im Vergleich zu Yes für die einzelnen PxxP-Motive verändert hatte. Dazu wurde ein Phagen-ELISA analog zu 3.2.1 mit den sieben GST-Px-Peptiden durchgeführt (Tab. 3.7). Bei Verwendung der Phagen mit SH3-p3-Fusion (maximal 5 Kopien der SH3-Domäne pro Phagen-Partikel) wurde nur Bindung an P5 detektiert. Bei den Phagen mit SH3-p8-Fusion (etwa 400 SH3-Domänen pro Phagen-Partikel) ergab sich für Yes-opt überraschenderweise

neben einer Interaktion mit P0, P3, P4 und P5 wie beim Wildtyp zusätzlich eine Interaktion mit P1, P2 und P6. Beim Phagen-Selektionsverfahren gegen das Volllänge-Sam68 wurde also als bester Binder eine SH3-Domäne identifiziert, die mit allen sieben Px-Peptiden von Sam68 interagiert, was die beobachtete Gesamtaffinität deutlich erhöht. Dies erklärt auch den oben beschriebenen FRET-Effekt zwischen YFP-Yes-opt und Sam68 $\Delta$ P0345, bei dem die Motive P1, P2 und P6 unverändert sind.

**Tabelle 3.7 Interaktion von Yes und Yes-opt mit den Px-Peptiden von Sam68**

SH3-Domäne		P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6
p3-Fusion	Yes						++	
	Yes-opt						++++	
p8-Fusion	Yes	+			++	+	+++	
	Yes-opt	+++	++	++	+++	+++	++++	+++

Im Phagen-ELISA wurde die Bindung von Phagen, welche die SH3-Domänen Yes und Yes-opt jeweils als Fusion mit den Oberflächenproteinen p3 (monovalent) oder p8 (polyvalent) präsentieren, an die GST-Px-Peptide von Sam68 untersucht. Die Affinitäten der Interaktionen sind qualitativ nach demjenigen Phagen-Titer, bei dem halbmaximale Bindung erreicht wurde, wie folgt eingeteilt: '++++' <  $10^{10}$  cfu/ml; '+++ '  $10^{10}$  -  $10^{11}$  cfu/ml; '++' =  $10^{11}$  -  $10^{12}$  cfu/ml; '+' >  $10^{12}$  cfu/ml

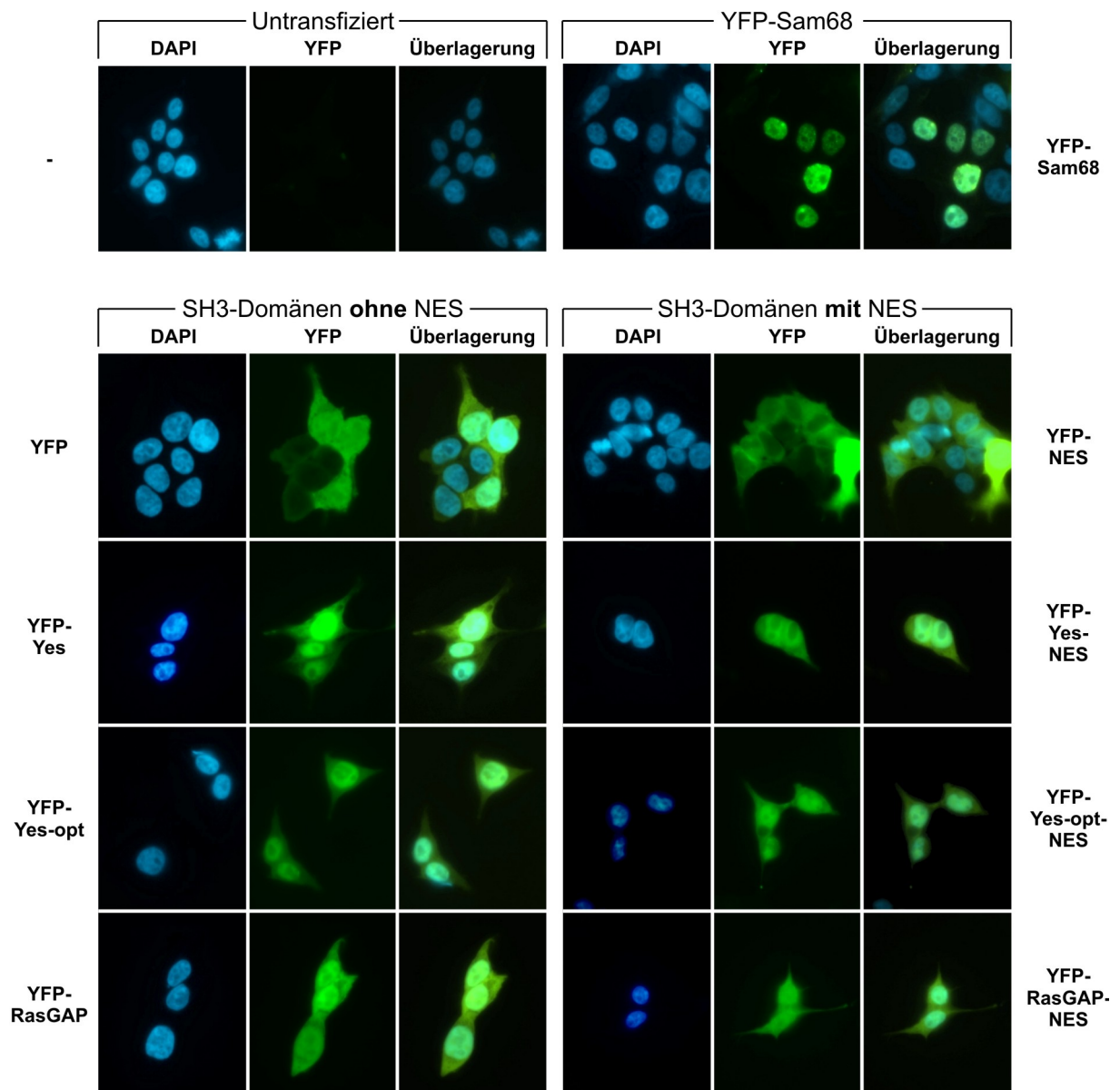
### **3.3.3 Subzelluläre Lokalisation der SH3-Domänen**

Wie zu Beginn des Kapitels ausgeführt, sollte untersucht werden, ob es möglich ist die subzelluläre Lokalisation von Sam68 zu verändern, indem man eine SH3-Domäne mit Kernexportsequenz (NES) in die Zelle einbringt. Dazu wurde an die YFP-Yes- und YFP-Yes-opt-Fusionsproteine sowie als Kontrolle an YFP und YFP-RasGAP die NES des Protein-kinase-Inhibitors (PKI) mit der Sequenz LALKLAGLDI am C-Terminus angefügt [175] (siehe 5.2.3 zur Beschreibung der Expressionsplasmide). Die Verwendung von SH3-Domänen mit YFP-Fusion erlaubt eine einfache Detektion der Proteine in der Zelle. Darüber hinaus werden die mit ca. 6 kDa relativ kleinen SH3-Domänen durch den heterologen Proteinanteil stabilisiert.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurden HEK293T-Zellen mit pEYFP-Yes, pEYFP-Yes-opt, pEYFP-RasGAP sowie den drei korrespondierenden NES-Konstrukten transfiziert, nach 48 Stunden fixiert und die Kerne mit DAPI gegengefärbt (siehe 2.4.5). Abb. 3.21 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Zellen bei Anregung von DAPI (blau) und YFP (grün, FITC-Filter) sowie die Überlagerung beider Bilder. Zum Vergleich wurden auch untransfizierte Zellen sowie mit pEYFP, pEYFP-NES und pEYFP-Sam68 transfizierte Zellen untersucht.



Untransfizierte Zellen wiesen keine Fluoreszenz im FITC-Kanal auf; YFP-Sam68 befand sich erwartungsgemäss ausschliesslich im Zellkern, wie die Überlagerung mit dem DAPI-Bild zeigt. Während YFP gleichmässig über die gesamte Zelle verteilt war, wie es aufgrund seiner Grösse zu erwarten ist (freie Diffusion durch die Kernporen), lokalisierte YFP-NES überwiegend im Cytoplasma, obgleich im Bereich der Kerne noch grüne Fluoreszenz erkennbar ist. Die YFP-SH3-Fusionsproteine waren ebenfalls über die gesamte Zelle verteilt, wobei es zu einer deutlichen Anreicherung in den Zellkernen kam, was mit einer Komplexbildung mit Sam68 im Einklang steht. Unklar ist allerdings, warum die RasGAP-



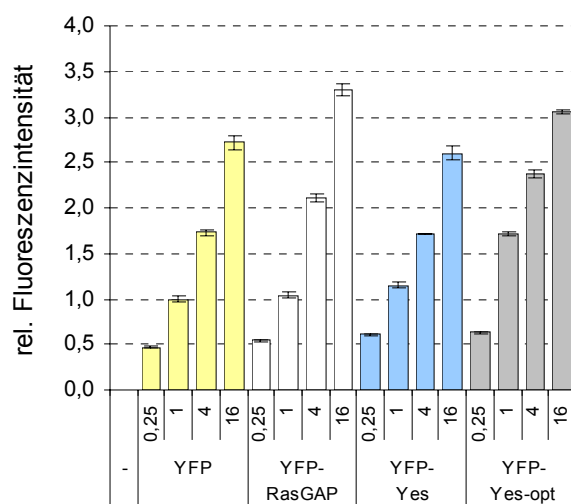
**Abb. 3.21 Subzelluläre Lokalisation der YFP-SH3-Fusionsproteine mit bzw. ohne NES**

HEK293T-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die angegebenen YFP-Fusionsproteine transfiziert, nach 24 h auf Deckgläsern ausgesät, nach weiteren 24 h fixiert, DAPI-gefärbt und eingedeckt. Repräsentative Zellen wurden bei entsprechender Anregung im DAPI- und im FITC-Filter bei 630-facher Vergrösserung fotografiert. Gezeigt ist jeweils die Fluoreszenz von DAPI und YFP sowie die Überlagerung beider Bilder.

SH3-Domäne ebenfalls eine nukleäre Anreicherung aufweist. Möglicherweise findet hier eine Interaktion mit einem anderen Kernprotein als Sam68 statt. Unerwarteterweise ergab sich für die YFP-SH3-Proteine mit NES ebenfalls ein Lokalisationsmuster mit Anreicherung im Zellkern, wenn auch die Fluoreszenzintensität im Kern geringer war als bei den Konstrukten ohne NES. Dies lässt vermuten, dass der NES-vermittelte Kernexportmechanismus schwächer ist als der Sam68-NLS-vermittelte Import. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass ein Teil des Sam68 durch die Wechselwirkung mit SH3-NES ins Cytoplasma verlagert wird, wodurch die Gleichgewichtskonzentration im Kern abnimmt. Eine Färbung von Sam68 konnte jedoch nicht durchgeführt werden, weil YFP aufgrund seiner spektralen Eigenschaften ebenfalls Licht im roten Wellenlängenbereich emittiert, was die Verwendung einer dritten Farbe verhindert.

### **3.3.4 Einfluss der SH3-Domänen ohne NES auf die HIV-Replikation**

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass eine isolierte SH3-Domäne, die sehr stark an Sam68 bindet, dessen Funktion im Rahmen der HIV-Replikation beeinträchtigt, z. B. indem die Wechselwirkung von Sam68 mit anderen zellulären oder viralen Proteinen wie Rev blockiert wird. Um diese Hypothese zu testen, wurde ein HIV-Replikations-Assay (siehe 2.4.6) durchgeführt: HEK293T-Zellen wurden mit dem proviralen Plasmid pNL4-3 und pEYFP-Yes- oder pEYFP-Yes-opt cotransfiziert und anschliessend untersucht, ob sich dadurch die Viruspartikelproduktion veränderte. Als Kontrollen wurden auch pEYFP ohne SH3-Domäne sowie pEYFP-RasGAP mitgeführt, das nicht mit Sam68 interagiert. Um eine eventuelle Dosisabhängigkeit der Proteine beurteilen zu können, wurden die Plasmide in verschiedenen molaren Verhältnissen bezogen auf pNL4-3 eingesetzt, nämlich 1 : 0,25, 1 : 1, 1 : 4 und 1 : 16. Zur Quantifizierung der neu entstandenen Viruspartikel wurden jeweils nach 24 und 48 h die Zellkultur-Überstände abgenommen und mittels des p24-ELISAs analysiert. Die Kontrolle der YFP-SH3-Produktion (Abb. 3.22) erfolgte durch

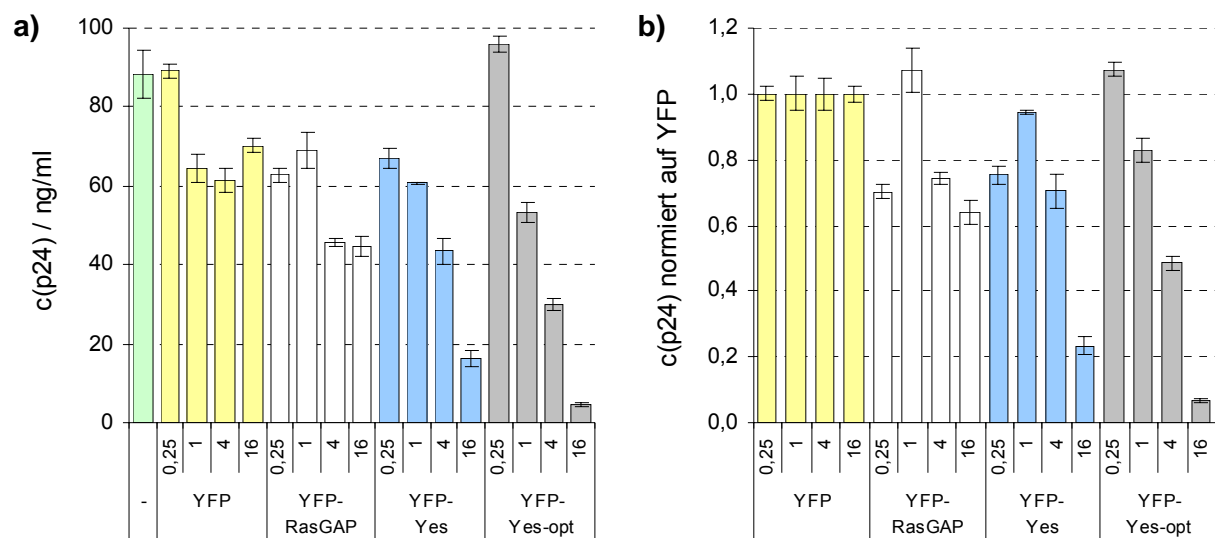


**Abb. 3.22**  
**Nachweis der YFP(-SH3)-Expression mittels Fluoreszenzmessung**

HEK293T-Zellen wurden mit 0,25 µg psynGagPol und pEYFP (gelb), pEYFP-RasGAP (weiss), pEYFP-Yes (blau) oder pEYFP-Yes-opt (grau) im molaren Verhältnis 1 : 0,25, 1 : 1, 1 : 4 und 1 : 16 wie angegeben cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und die Fluoreszenzintensität mit dem FACS im FITC-Kanal gemessen. Gezeigt sind die auf die Probe YFP 1 : 1 normierten Werte (Mittelwert von Dreifachansätzen ± Standardfehler).

Fluoreszenzmessung mit dem Durchflusscytometer (siehe 2.4.4). Wie erwartet wurden alle vier Proteine in linear zunehmenden Mengen produziert, wobei eine Vervielfachung der transfizierten Plasmidmengen jeweils nur zu etwa einer Verdopplung der Proteinmengen führte.

Abb. 3.23a zeigt die gemessenen Viruspartikel-Mengen in Abhängigkeit von der Produktion der verschiedenen YFP-SH3-Domänen. Bedingt durch die Komplexität des Assays schwanken die Werte zwar relativ stark, aber es ist eindeutig erkennbar, dass die Viruspartikelproduktion durch die Anwesenheit grösserer Mengen YFP-Yes und YFP-Yes-opt stark beeinträchtigt wird, nicht jedoch durch YFP oder YFP-RasGAP. Dies lässt darauf schliessen, dass die Inhibition tatsächlich Sam68-spezifisch ist. Yes-opt führt zwar zu einer leicht stärkeren Hemmung als Yes, aber auch die Affinität der Yes-SH3-Domäne scheint bereits hoch genug für die effektive Bindung an Sam68 zu sein. In beiden Fällen ist jedoch eine ausreichend grosse Anzahl Yes(-opt)-Moleküle zur Inhibition erforderlich. In Abb. 3.23b wurden die Werte der verschiedenen YFP-SH3-Proben jeweils auf die YFP-Proben normiert, um eventuelle Effekte auszugleichen, die von der Überexpression der Fremdproteine herrühren. Es ergibt sich ein vergleichbares Bild.



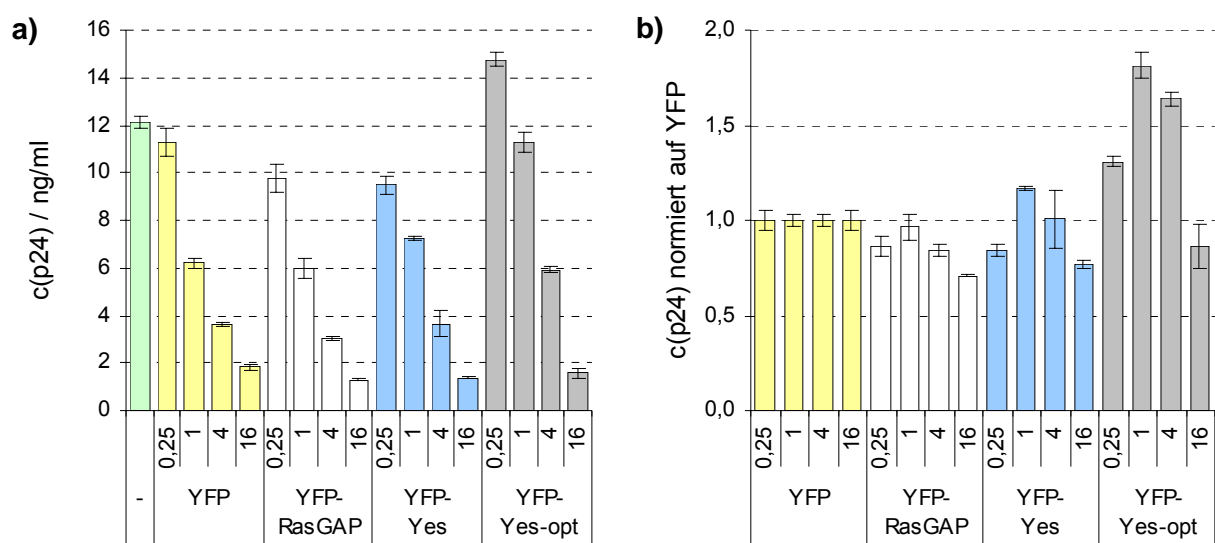
**Abb. 3.23 Einfluss der SH3-Domänen auf die HIV-Replikation**

HEK293T-Zellen wurden mit 0,5 µg pNL4-3 (grün) und pEYFP (gelb), pEYFP-RasGAP (weiss), pEYFP-Yes (blau) oder pEYFP-Yes-opt (grau) im molaren Verhältnis 1 : 0,25, 1 : 1, 1 : 4 und 1 : 16 wie angegeben cotransfiziert. Nach 24 h und 48 h wurde jeweils der Zellkulturüberstand abgenommen und die Menge an produziertem Virus durch ELISA-Messung der p24-Konzentration quantifiziert (Mittelwert von Dreifachansätzen ± Standardfehler).

**a)** Absolut gemessene p24-Konzentrationen; zur besseren Übersicht wurden die 24 h- und 48 h-Werte aufsummiert. **b)** Die Werte aus a) wurden jeweils auf den zugehörigen YFP-Wert normiert.

Prinzipiell könnte die oben beschriebene Inhibition der HIV-Replikation durch die Yes- und Yes-opt-SH3-Domänen auch Sam68-unabhängig durch einen indirekten Effekt auf die

Vitalität oder den Metabolismus der Zelle verursacht werden. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Hemmung tatsächlich spezifisch für die HIV-Replikation ist, wurde ein analoges Experiment durchgeführt, bei dem anstelle des proviralen Plasmids ein Kontroll-Konstrukt eingesetzt wurde. Die Wahl fiel auf psynGagPol, welches das *gagpol*-Gen in einer codon-optimierten Version unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert, so dass es nicht dem HI-viralen RNA-Metabolismus unterliegt und damit Sam68-unabhängig exprimiert werden sollte. Das produzierte Protein ist identisch mit demjenigen des Provirus, so dass das gesamte Experiment unter den gleichen Bedingungen durchgeführt werden kann und eine optimale Vergleichbarkeit gewährleistet ist.



**Abb. 3.24 Einfluss der SH3-Domänen auf die Produktion von synGagPol**

HEK293T-Zellen wurden mit 0,25 µg psynGagPol (grün) und pEYFP (gelb), pEYFP-RasGAP (weiss), pEYFP-Yes (blau) oder pEYFP-Yes-opt (grau) im molaren Verhältnis 1 : 0,25, 1 : 1, 1 : 4 und 1 : 16 wie angegeben cotransfiziert. Nach 24 h und 48 h wurde jeweils der Zellkulturüberstand abgenommen und die Menge an produzierten Partikeln durch ELISA-Messung der p24-Konzentration quantifiziert (Mittelwert von Dreifachansätzen ± Standardfehler).

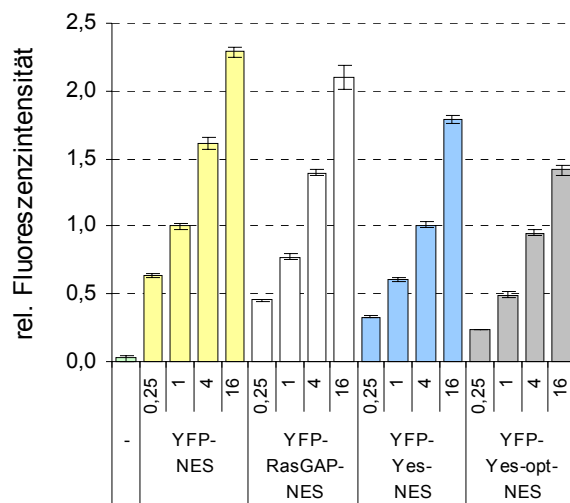
**a)** Absolut gemessene p24-Konzentrationen; zur besseren Übersicht wurden die 24 h- und 48 h-Werte aufsummiert. **b)** Die Werte aus a) wurden jeweils auf den zugehörigen YFP-Wert normiert.

Wie man Abb. 3.24a entnehmen kann, führte die Coexpression von *syngagpol* mit den YFP-Konstrukten unerwarteterweise zu einer ausgeprägten Dosis-abhängigen Inhibition der Partikelproduktion, und zwar unabhängig davon, ob das YFP mit einer SH3-Domäne fusioniert war. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, dass sowohl *syngagpol* als auch die *yfp(-SH3)*-Gene unter der Kontrolle des CMV-Promotors stehen, so dass es zu einer Konkurrenz um bestimmte Transkriptionsfaktoren der Zelle kommt, wohingegen das oben eingesetzte provirale Plasmid den HIV-eigenen LTR-Promotor trägt. Dieser Promotor-Effekt lässt sich durch Normierung der gemessenen Werte der YFP-SH3-Ansätze auf die zugehörigen Werte der YFP-Ansätze kompensieren (Abb. 3.24b). Die transformierten Werte

zeigen wie erwartet, dass die SH3-Domänen keinen Einfluss auf die Partikelproduktion von synGagPol haben. Die gemeinsame Betrachtung beider Experimente bestätigt also, dass die Inhibition durch die Yes- und Yes-opt-SH3-Domänen spezifisch für die HIV-Replikation ist und somit höchstwahrscheinlich auf eine Beeinträchtigung von Sam68 zurückzuführen ist.

### 3.3.5 Einfluss der SH3-Domänen mit NES auf die HIV-Replikation

Wie zu Beginn des Kapitels dargelegt, sollte geprüft werden, ob SH3-Domänen mit einer Kernexportsequenz einen dominant negativen Einfluss auf die HIV-Replikation haben, indem sie zu einer Verlagerung des im Zellkern benötigten Sam68 ins Cytoplasma führen. Zwar hatten die Lokalisationsstudien gezeigt, dass die hier untersuchten SH3-NES-Domänen vorwiegend im Kern vorliegen, aber möglicherweise wird dennoch ein Teil des Sam68 ins Cytoplasma relokalisiert, was bereits einen Einfluss auf die Virusproduktion haben könnte. Daher wurden dieselben Experimente wie in 3.3.4 beschrieben mit den analogen YFP(-SH3)-Konstrukten mit Kernexportsequenz wiederholt. Abb. 3.25 zeigt, dass die YFP(-SH3)-NES-Konstrukte in diesen Versuchen ebenfalls in linear zunehmenden Mengen produziert wurden.

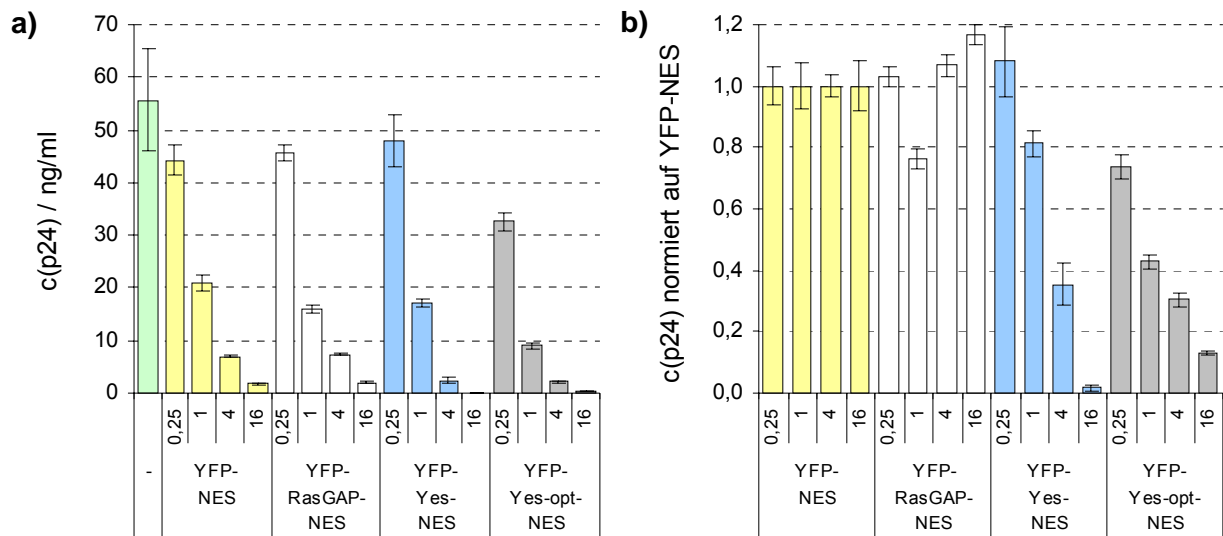


**Abb. 3.25**  
**Nachweis der YFP(-SH3)-NES-Expression**  
**mittels Fluoreszenzmessung**

HEK293T-Zellen wurden mit 0,25 µg psynGagPol und pEYFP-NES (gelb), pEYFP-RasGAP-NES (weiss), pEYFP-Yes-NES (blau) oder pEYFP-Yes-opt-NES (grau) im molaren Verhältnis 1 : 0,25, 1 : 1, 1 : 4 und 1 : 16 wie angegeben cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und die Fluoreszenzintensität mit dem FACS im FITC-Kanal gemessen. Gezeigt sind die auf die Probe YFP 1 : 1 normierten Werte (Mittelwert von Dreifachansätzen ± Standardfehler).

Abb. 3.26a zeigt den Einfluss der YFP(-SH3)-NES-Proteine auf die Viruspartikelproduktion. Überraschenderweise wiesen alle vier Konstrukte einen sehr stark negativen und dosisabhängigen Effekt auf die HIV-Replikation auf, auch das YFP-NES-Konstrukt ohne SH3-Domäne. Zwei Erklärungen sind für diese Beobachtung denkbar: Entweder hat die NES-Sequenz einen generellen Effekt auf den Zellmetabolismus, oder die NES-Sequenz stört gezielt die HIV-Replikation. Ersteres ist unwahrscheinlich, weil dann auch ein Effekt auf die Expression der Konstrukte selber zu erwarten wäre. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie der Vergleich der Expressionskontrollen der SH3-Domänen mit und ohne NES zeigt (Abb. 3.25 vs. 3.22). Ausserdem wurden in der Literatur keine derartigen Effekte für ähnliche Konstrukte

beschrieben [175]. Ein HIV-spezifischer Effekt wäre dadurch erklärbar, dass die YFP(-SH3)-NES-Proteine mit dem Rev/RRE-Komplex um die CRM1-Exportmaschinerie konkurrieren, schliesslich stellt die verwendete NES des Proteinkinase-Inhibitors das stärkste bekannte CRM1-abhängige Exportsignal dar [176]. Korrigiert man den Effekt wiederum durch Normierung auf YFP-NES (Abb. 3.26b), ergibt sich ein Bild, das demjenigen der SH3-Domänen ohne NES entspricht (vgl. Abb. 3.23b), was die obigen Ergebnisse bestätigt. Der generelle Effekt der NES und der spezielle Effekt der Yes- und Yes-opt-SH3-Domänen sind also additiv.



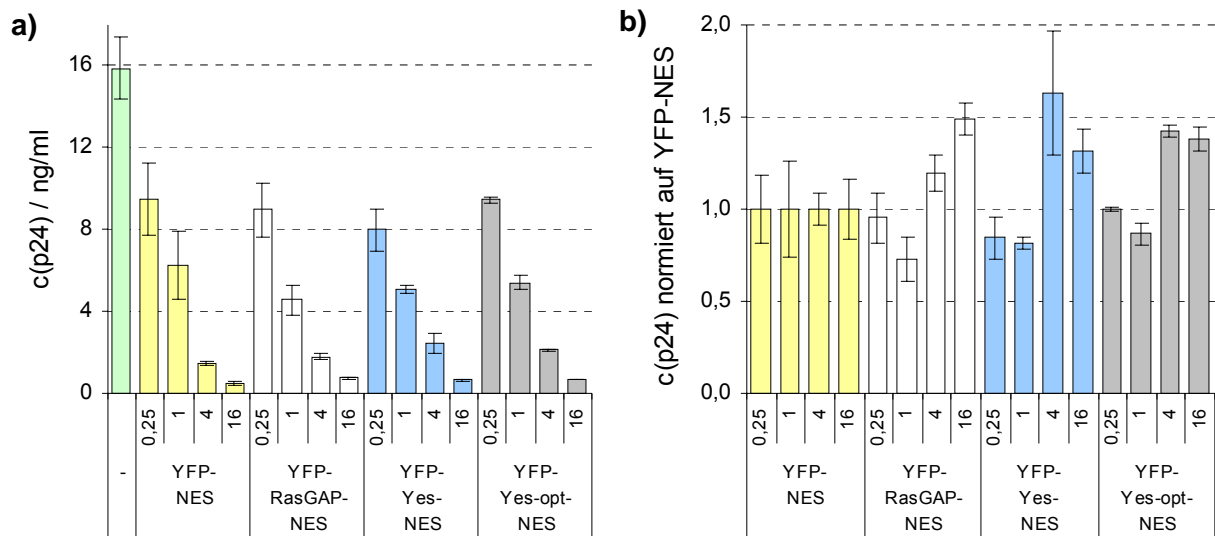
**Abb. 3.26 Einfluss der SH3-Domänen mit NES auf die HIV-Replikation**

HEK293T-Zellen wurden mit 0,5 µg pNL4-3 und pEYFP-NES (gelb), pEYFP-RasGAP-NES (weiss), pEYFP-Yes-NES (blau) oder pEYFP-Yes-opt-NES (grau) im molaren Verhältnis 1 : 0,25, 1 : 1, 1 : 4 und 1 : 16 wie angegeben cotransfiziert. Nach 24 h und 48 h wurde jeweils der Zellkulturüberstand abgenommen und die Menge an produziertem Virus durch ELISA-Messung der p24-Konzentration quantifiziert (Mittelwert von Dreifachansätzen  $\pm$  Standardfehler).

**a)** Absolut gemessene p24-Konzentrationen; zur besseren Übersicht wurden die 24 h- und 48 h-Werte aufsummiert. **b)** Die Werte aus a) wurden jeweils auf den zugehörigen YFP-NES-Wert normiert.

Ebenfalls in Analogie zu den vorherigen Versuchen wurde der Einfluss der YFP(-SH3)-NES-Konstrukte auf die Produktion von synGagPol-Partikeln getestet. Auch hier war wieder die generelle Hemmung wie in Abb. 3.24 zu beobachten, die höchstwahrscheinlich auf den Promotor-vermittelten Effekt zurückgeht. Vergleicht man die Absolutwerte beider Versuche miteinander, so scheint eine Verstärkung dieses Effekts durch die NES unwahrscheinlich. Insgesamt lässt sich also schlussfolgern, dass die beobachtete NES-vermittelte Hemmung der HIV-Replikation einen eigenständigen spezifischen Mechanismus darstellt.





**Abb. 3.27 Einfluss der SH3-Domänen mit NES auf die Produktion von synGagPol**

HEK293T-Zellen wurden mit 0,25 µg psynGagPol und pEYFP-NES (gelb), pEYFP-RasGAP-NES (weiss), pEYFP-Yes-NES (blau) oder pEYFP-Yes-opt-NES (grau) im molaren Verhältnis 1 : 0,25, 1 : 1, 1 : 4 und 1 : 16 wie angegeben cotransfiziert. Nach 24 h und 48 h wurde jeweils der Zellkulturüberstand abgenommen und die Menge an produzierten Partikeln durch ELISA-Messung der p24-Konzentration quantifiziert (Mittelwert von Dreifachansätzen ± Standardfehler).

**a)** Absolut gemessene p24-Konzentrationen; zur besseren Übersicht wurden die 24 h- und 48 h-Werte aufsummiert. **b)** Die Werte aus a) wurden jeweils auf den zugehörigen YFP-NES-Wert normiert.

### 3.3.6 Zusammenfassung

Wie in diesem Abschnitt dargelegt, wirken hoch-affine Sam68-bindende SH3-Domänen als Inhibitoren der HIV-Replikation. Da die möglichen Mechanismen der Hemmung auf einer Bindung der SH3-Domäne an Sam68 beruhen, wurde im ersten Schritt eine höher-affine SH3-Domäne generiert. Ausgehend vom besten Sam68-Binder, der Yes-SH3-Domäne, wurde mittels eines Mutagenese-/Phagenselektions-Verfahrens die Yes-Variante »Yes-opt« gewonnen, die 67x stärker an Sam68 bindet. Eine eingehende Charakterisierung bestätigte, dass Yes-opt ein starker Sam68-Binder ist. Die Produktion von YFP-Yes und YFP-Yes-opt, nicht jedoch von YFP und YFP-RasGAP, führte zu einer dosis-abhängigen Hemmung der HIV-Replikation, was für einen Sam68-abhängigen Mechanismus spricht. Entsprechend hatten die SH3-Domänen erwartungsgemäss keinen Einfluss auf die Produktion von synGagPol. Parallel hierzu wurden dieselben SH3-Domänen mit einem angefügten C-terminalen Kernexportsignal untersucht. Lokalisationsstudien zeigten jedoch, dass die Proteine nicht im Cytoplasma angereichert wurden, was möglicherweise auf die Bindung an Sam68 zurückzuführen ist, dessen Kernlokalisierungssignal demnach stärker als die NES ist. Unerwarteterweise wirkten dennoch alle getesteten NES-Konstrukte, auch das YFP-NES ohne SH3-Domäne, stark replikationshemmend. Dies ist höchstwahrscheinlich durch eine Konkurrenz der NES-haltigen Proteine mit Rev/RRE um die Kernexportmaschinerie zu erklären und somit ein zusätzlicher, allerdings Sam68-unabhängiger, antiviraler Effekt.

## 4. Diskussion

---

Das Protein Sam68 ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, wie z. B. der Zellzyklusregulation, dem alternativen Spleissen oder verschiedenen Signaltransduktionswegen [56]. Darüber hinaus ist eine Beteiligung von Sam68 am RNA-Metabolismus während der HIV-Replikation durch zahlreiche Arbeiten gut belegt [134].

Sam68 zeichnet sich dadurch aus, dass es neben einer RNA-Bindungsdomäne auch mehrere Motive zur Interaktion mit Signaltransduktionsproteinen besitzt. Somit stellt es ein Bindeglied zwischen der Signalverarbeitung der Zelle und der Regulation des RNA-Metabolismus dar. Beispielsweise führt die Tyrosin-Phosphorylierung von Sam68 durch die Kinase Fyn zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen zwei Spleissprodukten des Apoptose-Regulators Bcl, nämlich von der pro-apoptotischen Bcl-x(s)-Isoform hin zur anti-apoptotischen Bcl-x(L)-Isoform [116]. Fyn tritt dabei u. a. über eine SH3-Domäne mit Sam68 in Wechselwirkung, das mit sieben Prolin-reichen Sequenzen ungewöhnlich viele SH3-Bindestellen aufweist.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die umfassende Analyse der vielfältigen Sam68-SH3-Interaktionen (siehe 4.1) mit dem Ziel, zu klären, ob solche Wechselwirkungen auch eine Rolle im Rahmen der HIV-Replikation spielen und ob sich daraus Ansätze zur Virus-Inhibition ableiten lassen (siehe 4.2).

### 4.1 Interaktion von Sam68 mit SH3-Domänen

---

Sam68 besitzt sieben\* Prolin-reiche Sequenzen mit einem PxxP-Kern-Motiv (fortan mit P0 bis P6 oder allgemein mit Px bezeichnet), die als potentielle Bindestellen für SH3-Domänen fungieren können. Wie in der Einleitung beschrieben, wurden bereits 18 Proteine identifiziert, die SH3-Domänen-abhängig an Sam68 binden (siehe Tab. 1.4 und dortige Referenzen). Weil allerdings bislang keine systematische Studie durchgeführt wurde, besteht die Möglichkeit, dass wichtige, hoch-affine Sam68-Bindepartner nicht entdeckt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein Phagen-Display-Screening unter Verwendung einer M13-basierten Bibliothek durchgeführt, welche mit 291 SH3-Domänen fast das gesamte humane SH3-Proteom abbildet [18]. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Analyse diskutiert (siehe 4.1.1) sowie die darauf aufbauenden Untersuchungen zur Affinität der SH3-Domänen (siehe 4.1.2) und ihrer Selektivität für einzelne Px-Motive (siehe 4.1.3). Abschliessend werden die mögliche biologische Bedeutung der beobachteten Breite an Wechselwirkungen sowie Implikationen der neu identifizierten Binder erörtert (siehe 4.1.4).

---

\* Nach der erstmaligen Sequenzierung des *sam68*-Gens wurde korrekt erkannt, dass sieben Px-Motive vorhanden sind [54]. Die Angaben in der neueren Literatur schwanken unerklärlicherweise zwischen fünf und meistens sechs Px-Motiven wie im Review von LUKONG & RICHARD [100], wo das Motiv P6 vergessen wurde.



#### **4.1.1 Identifizierung Sam68-bindender SH3-Domänen**

Zur Identifizierung Sam68-bindender SH3-Domänen wurde ein Bio-Panning mit der SH3-Phagenbibliothek gegen rekombinant hergestelltes Sam68 durchgeführt. Zum Vergleich wurde parallel als Negativ-Kontrolle GST eingesetzt, das keine SH3-Bindestellen besitzt. Die Sequenzierung der *sh3*-Gene von 74 Sam68-Bindern aus der ersten Runde des Bio-Pannings lieferte insgesamt 38 verschiedene Kandidaten (siehe Tab. 3.1), was die Frage aufwirft, ob tatsächlich so viele Sam68-Binder existieren, oder ob sich auch falsch-positive Kandidaten darunter befinden. Letzteres kann nicht ausgeschlossen werden, weil die Phagen-Eluate zu einem gewissen Grad immer auch unspezifische Binder enthalten, was man z. B. daran sehen kann, dass beim GST-Kontrollansatz ebenfalls eine grosse Anzahl Phagen eluiert wurde. Der Titer der von Sam68 eluierten Phagenlösung war jedoch um den Faktor 44 grösser als derjenige von GST, was auf eine deutliche Anreicherung spezifisch Sam68-bindender Phagen hindeutet.

Mehrfach gefundene Kandidaten dürften dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit echte Sam68-Binder darstellen. 8 der 38 SH3-Domänen dieses Screens wurden jeweils mindestens dreimal identifiziert, wobei sie zusammengenommen 53 % aller Sequenzen repräsentieren. 5 dieser 8 Kandidaten (Lyn, Nck1, p85 $\alpha$ , Src und Yes) sind bereits zuvor in der Literatur als Sam68-Binder beschrieben worden (vgl. Tab. 1.4); die anderen 3 wurden neu entdeckt (Hck, Intersectin 2 und OSF). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ausserdem für jede dieser 8 SH3-Domänen die Bindung an Sam68 in unabhängigen Testsystemen (Pull-Down-Assay, FRET-Analyse) bestätigt werden. Von den übrigen 30 Kandidaten wurden darüber hinaus ebenfalls bereits 5 in der Literatur als Sam68-Binder charakterisiert und einige weitere stellen aufgrund ihrer Homologie zu verifizierten Bindern plausible Kandidaten dar (z. B. Btk als Vertreter der SFKs, Grb2-homologes Protein). Es ist also davon auszugehen, dass es sich wenigstens bei einem Grossteil der nur einmal identifizierten SH3-Kandidaten ebenfalls um Sam68-Binder handelt. Bei der Sequenzierung weiterer Phagmide würden darüber hinaus vermutlich noch mehr dieser selten vertretenen Binder gefunden.

Insgesamt betrachtet konnte das Phagen-Display-Verfahren also mit sehr gutem Erfolg durchgeführt werden, wobei nicht nur bereits beschriebene Interaktionspartner bestätigt sondern auch einige neue, teils hoch-affine Sam68-Binder identifiziert wurden.

Ein Nachteil des Bio-Panning-Verfahrens an sich besteht darin, dass möglicherweise nicht alle bindenden SH3-Domänen für ein gegebenes Protein identifiziert werden. Hier kommen zwei unterschiedliche Effekte zum Tragen: Existiert ein dominanter Binder, wie z. B. die Hck-SH3-Domäne für das HIV-Protein Nef [18], muss man sehr viele Phagmide sequenzieren, um seltene, niedrig-affine Binder zu finden. Hat man hingegen ein Protein mit breitem Bindungsprofil wie das hier beschriebene Sam68, muss man ebenfalls sehr viele

Sequenzierungen durchführen, um die Vielfalt der Binder zu erfassen. Das Problem liesse sich am elegantesten durch den Einsatz eines SH3-Micro-Arrays lösen, mit dem parallele Einzelanalysen aller SH3-Protein-Wechselwirkungen möglich wären. Der geradlinigste Weg wäre, diesen Micro-Array mit den SH3-Phagen zu beschichten und die Bindung eines beliebigen Zielproteins mit einem geeigneten Antikörper zu detektieren. Erste Versuche dazu in Kooperation mit der Arbeitsgruppe SCHÄFERLING (Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik, Universität Regensburg) ergaben jedoch, dass beim Einsatz von Phagen nur eine sehr niedrige Sensitivität erreicht wird. Als deutlich besser erwies sich der Einsatz rekombinant hergestellter GST-SH3-Proteine (vgl. auch [75]). Allerdings wäre die Produktion sämtlicher 300 GST-SH3-Domänen mit einem sehr hohen Entwicklungsaufwand verbunden. Eine interessante Alternative stellt das Konzept von K. SAKSELA dar, die Identität der Phagen aus dem Bio-Panning nicht durch Infektion/Phagmid-Sequenzierung zu bestimmen, sondern die Phagen-DNA zu isolieren und direkt zur Hybridisierung eines Micro-Arrays mit *sh3*-spezifischen Oligonucleotiden einzusetzen (K. SAKSELA, persönliche Mitteilung).

Wie oben ausgeführt wurde mit Hilfe des Phagen-Display-Verfahrens also eine Vielzahl von Sam68-bindenden SH3-Domänen identifiziert. Für die weitere Charakterisierung wurde auf neun SH3-Domänen fokussiert, nämlich die o. g. besten acht Binder des Bio-Pannings sowie die Fyn-SH3-Domäne, weil sie in der Literatur als Sam68-Binder sehr gut beschrieben ist.

#### **4.1.2 Analyse der Affinitäten von Sam68-SH3-Interaktionen**

Aussagen über die relativen Affinitäten der Sam68-SH3-Interaktionen anhand der Sequenzierungs-Häufigkeit bestimmter Kandidaten des Bio-Pannings können aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs nicht getroffen werden. Daher wurde ein quantitativer Phagen-ELISA zur Analyse der einzelnen Sam68-SH3-Interaktionspaare etabliert (siehe 2.2.4 und 3.1.5).

Die dabei erhaltenen Bindungskurven zeigten erwartungsgemäss den typischen Sättigungsverlauf einer einfachen Protein-Protein-Interaktion (siehe Abb. 3.3). Prinzipiell liesse sich die Dissoziationskonstante  $K_d$  errechnen, indem man die erhaltenen OD-Werte nach SCATCHARD transformiert (siehe Abb. 3.5). Dazu müsste allerdings die Konzentration der SH3-Domänen bekannt sein, was jedoch nicht der Fall ist, da zwar eine definierte Menge Phagen eingesetzt wurde, aber die Anzahl an SH3-Domänen pro Phagen-Partikel unbekannt ist.

Um diesen Wert zu ermitteln wurde eine analoger ELISA mit dem Hck-SH3-Phagen und rekombinant hergestelltem Nef durchgeführt. Für dieses Interaktionspaar wurde mittels SPR-Messungen ein  $K_d$ -Wert von 250 nM ermittelt [17]. KÄRKKÄINEN *et al.* bestimmten für diese Interaktion mittels eines ähnlichen ELISA-Formats, bei dem allerdings statt der SH3-Phagen aufgereinigte GST-SH3-Fusionsproteine eingesetzt wurden, einen gut übereinstimmenden  $K_d$ -Wert von 285 nM [18]. Aus dem SCATCHARD-Plot für Nef-Hck (siehe Abb. 3.4b) ergibt sich

dann unter Berücksichtigung des  $K_d$ -Werts von 250 nM ein Korrekturfaktor für die Konzentration von ca. 420 SH3-Domänen pro Phagen-Partikel.

Die Plausibilität dieser Grössenordnung zeigt der Vergleich mit Literatur-Daten: Fusionen mit dem M13-Hauptoberflächenprotein p8 können nur bis zu einer Länge von 5 - 8 Aminosäuren toleriert werden [177]. Die Inkorporation grösserer p8-Fusionsproteine ist nur mit dem – auch in dieser Arbeit eingesetzten – Hybridsystem möglich, wobei neben dem Fusionsprotein auch Wildtyp-p8 von einem Helferphagen produziert wird, so dass eine Mosaik-Hülle aus beiden Proteinen assembliert wird. Bei einer p8-Fusion mit 15-mer-Peptiden (ca. 1,7 kDa) wird das heterologe Oberflächenprotein zu 30 - 40 % inkorporiert [178], bei einer Fusion mit einem Antikörper- $F_{ab}$ -Fragment (ca. 50 kDa) immerhin noch bis zu 24 Stück [179]. Zwar gibt es keinen linearen Zusammenhang zwischen der Grösse des p8-Fusionsanteils und der Inkorporationsmenge, weil auch die Form des Proteins eine wichtige Rolle spielt [180], aber der oben ermittelte Wert von 420 SH3-Domänen (ca. 7 kDa), was bei knapp 1600 p8-Hüllproteinen etwa 26 % entspricht, fügt sich gut ins Bild. Die Annahme, dass dieser für Hck-SH3 ermittelte Wert auch für alle anderen SH3-Domänen gilt, ist insofern gerechtfertigt, als die Proteine eine sehr ähnliche Grösse und konservierte Faltung aufweisen.

Mit diesem Korrekturfaktor war es schliesslich möglich, die SH3-Domänen-Konzentration abzuschätzen und somit aus den ELISA-Daten  $K_d$ -Werte für die einzelnen Sam68-SH3-Interaktionspaare zu berechnen (siehe Abb. 3.5). Die dabei ermittelten Werte liegen alle im niedrigen nanomolaren Bereich. Dieser Befund ist überraschend, wenn man bedenkt, dass SH3-Interaktionen allgemein in der Literatur als schwache Wechselwirkungen im niedrigen mikromolaren Bereich eingestuft werden [181,16]. Diese Einschätzung beruht allerdings in erster Linie auf Studien, die mit kurzen Peptiden als SH3-Liganden durchgeführt wurden, während die selten untersuchten Volllänge-Proteine oft deutlich höhere Affinitäten aufweisen [182]. Beispielsweise beobachteten LANDGRAF *et al.* bei einer Analyse von SH3-Domänen der Hefe, dass der  $K_d$ -Wert der Wechselwirkung der Abp1-SH3-Domäne von über 100  $\mu$ M bereits auf 40  $\mu$ M abnimmt, wenn das zugehörige PxxP-Peptid von 14 auf 17 Aminosäuren verlängert wird [183]. In der Literatur lassen sich weitere Beispiele für hoch-affine SH3-Domänen-Interaktionen finden, wie z. B. Pak2/ $\beta$ -Pix-SH3 mit 59 nM [18], PAK2/POSH2-SH3 mit 75 nM [18], 12-mer-Peptid/m-cort-SH3 mit 140 nM [184] oder 13-mer-Peptid/GadsC-SH3 mit 118 nM [185]. Affinitäten im nanomolaren Bereich sind also nicht ungewöhnlich, wenn – wie auch bei den vorliegenden Untersuchungen mit Sam68 – längere Peptide bzw. das Volllänge-Protein studiert werden. Dennoch ist die stärkste hier beobachtete Interaktion (Sam68/Yes-SH3) mit 5,5 nM noch um eine Grössenordnung stärker als die beste der oben genannten Beispiele.

Es besteht die Möglichkeit, dass dies zum Teil auf Assay-bedingte Rahmenbedingungen zurückzuführen ist. Indirekte ELISA-Formate – wie das hier angewandte – beruhen auf einer

Adsorption des Antigens (hier Sam68) an eine Oberfläche (ELISA-Platte). Dadurch besteht zum einen die Gefahr, dass sich die Konformation des Proteins und damit auch die Kinetik der Interaktion ändert. Für Sam68 ist dies unwahrscheinlich, da aufgrund von Sekundärstrukturvorhersagen die Prolin-reichen Sequenzen ohnehin in unstrukturierten Bereichen lokalisiert sind (vgl. Abb. 3.16). Zum anderen studiert man im ELISA-System *de facto* nicht mehr die Interaktion zweier Proteine in Lösung sondern betrachtet ein Grenzflächensystem zwischen Festphase und Lösung. Der dabei ermittelte *apparente*  $K_d$ -Wert kann unter Umständen vom *realen*  $K_d$ -Wert abweichen, weshalb kompetitive ELISA-Systeme grundsätzlich vorzuziehen wären [186]. Es gibt jedoch auch Beispiele die zeigen, dass dies nicht immer der Fall ist [187]. Im Folgenden wird vereinfachend davon ausgegangen, dass diese Assay-spezifischen Verzerrungen durch die Standardisierung des Phagen-ELISAs anhand der Nef-Hck-SH3-Interaktion ausgeglichen werden. (Es sei angemerkt, dass es sich bei der SPR-Messung (z. B. mittels Biacore®), die allgemein als zuverlässige Methode zur Bestimmung von  $K_d$ -Werten anerkannt ist, ebenfalls um eine Festphasen-Adsorption handelt [188].) Optimal wäre die Ermittlung der Sam68-SH3-Dissoziationskonstanten mittels isothermer Titrations-Kalorimetrie (ITK), wo die thermodynamischen Parameter der Bindungsreaktion direkt in Lösung gemessen werden. Ein Vergleich beider Datensätze dürfte interessante Erkenntnisse über die Qualität des hier etablierten Phagen-ELISAs liefern.

Der Hauptgrund für die im Rahmen der Arbeit ermittelten ungewöhnlich niedrigen  $K_d$ -Werte dürfte allerdings in der Tatsache liegen, dass das Volllänge-Sam68 mit seinen sieben Px-Motiven mehrere potentielle Bindestellen für SH3-Domänen zur Verfügung stellt. Wie weiter unten detailliert ausgeführt, binden die SH3-Domänen tatsächlich an bis zu vier der sieben Px-Motive, nämlich an P0, P3, P4 und P5. Es liegt also höchstwahrscheinlich eine polyvalente Bindung vor. Unklar ist jedoch, ob die Geometrie der Bindung vier Interaktionen gleichzeitig zulässt. Dazu müssten zum einen die SH3-Domänen auf dem recht starren Phagenpartikel hinreichend nahe und im richtigen Abstand beieinander stehen und zum anderen die Px-Motive genügend Abstand haben, damit die SH3-Domänen binden können ohne sich gegenseitig zu behindern. Letzteres ist insbesondere für die Motive P3, P4 und P5 nicht unbedingt gegeben, da sie nur durch 29 bzw. 20 AS voneinander getrennt werden. Aber auch zwei gleichzeitige SH3-Px-Bindungen könnten schon ausreichen, um die beobachtete Stärke der Wechselwirkung zu erklären.

Die erhöhte Affinität polyvalenter Wechselwirkungen ("Avidität") kann durch Kooperativität ( $\alpha$ ) oder Verstärkung ( $\beta$ ) bzw. eine Kombination beider Effekte zustande kommen [189]. Positive Kooperativität ( $\alpha > 1$ ) liegt vor, wenn durch Konformationsänderungen nach Bindung eines Liganden die Bindung des nächsten begünstigt wird, wie man es z. B. von der O<sub>2</sub>-Bindung an Hämoglobin kennt. Der Parameter  $\alpha$  konnte für die Sam68-SH3-Wechselwirkung

durch Auswertung der ELISA-Daten nach HILL zu  $\alpha = 1$  bestimmt werden. Die Interaktion der SH3-Domänen mit Sam68 ist also nicht kooperativ, was mit der o. g. Vorstellung von unstrukturierten Regionen, welche die Px-Motive enthalten, im Einklang steht. Folglich liegt für das Sam68-SH3-System eine Verstärkung vor (zur Unterscheidung von der Kooperativität gemäss MAMMEN *et. al* durch den Parameter  $\beta$  charakterisiert [189]). Kinetisch gesehen zeichnet sich die Verstärkung i. d. R. durch eine Abnahme der Dissoziationsgeschwindigkeit  $k_{off}$  aus: Löst sich die Bindung einer SH3-Domäne zu einem der Px, kann der Phage nicht sofort wegdiffundieren, weil er noch über eine weitere SH3-Domäne an ein anderes Px gebunden ist. Die Assoziationsgeschwindigkeit  $k_{on}$  bleibt annähernd gleich. Allgemein gilt  $K_d = k_{off} / k_{on}$ , so dass der niedrige beobachtete  $K_d$ -Wert durchaus durch eine Abnahme des  $k_{off}$ -Werts plausibel erklärt wäre. Um diese Theorie zu testen wäre eine vergleichende Messung der *on*- und *off-rate*-Kinetiken (durch SPR bestimmbar) der Sam68-Bindung an die Phagen bzw. monomeren SH3-Domänen überaus interessant.

Die Theorie der polyvalenten Verstärkung wird darüber hinaus durch die Phagen-ELISA-Analysen mit einzelnen Px-Motiven (siehe 4.1.3) gestützt. Hier wurde die Interaktion der SH3-Phagen mit monovalenten Px-Peptiden untersucht (vgl. Abb. 3.13), wobei z. B. die Interaktion des besten Binders mit dem besten Px-Motiv, nämlich Yes mit P5, um ca. Faktor 10 schwächer war als bei Einsatz des Volllänge-Sam68. Auf eine quantitative Auswertung der ELISA-Daten mit den Px-Peptiden wurde jedoch verzichtet, weil die Versuche nicht mehrfach durchgeführt wurden und ausserdem bei vielen Px-SH3-Paaren ein zu schwaches Signal für eine zuverlässige Interpretation erhalten wurde. Hinzu kommt, dass die Bindung u. U. auch durch Wechselwirkungen mit Sam68-Regionen beeinflusst wird, die nicht in den Peptiden enthalten sind.

Es sei angemerkt, dass die dargelegte quantitative Auswertung der Sam68-SH3-Bindungsdaten wie eingangs erwähnt von einem einfachen Ligand-Rezeptor-Modell ausgeht. Dies ist eine starke Vereinfachung, wenn man die polyvalente Natur der Interaktion bedenkt. Für eine exakte mathematische Behandlung müsste man ein entsprechend komplexes Modell anwenden, welches berücksichtigt, dass die Einzel-Bindungen der polyvalenten Komponenten unterschiedlich sind (die SH3-Domänen sind zwar identisch, nicht aber die Px-Motive). Dazu wären aufwändige und präzise Messungen der Interaktionen zwischen den monovalenten Peptiden, den monovalenten SH3-Domänen, dem polyvalenten Sam68 und den polyvalenten Phagen in sämtlichen Kombinationen nötig. Derartige Analysen hätten den Rahmen dieser Arbeit gesprengt und wurden daher nicht durchgeführt.

Insgesamt betrachtet war es also mit Hilfe des Phagen-ELISAs möglich, die Affinitäten der verschiedenen Sam68-bindenden SH3-Phagen zu bestimmen. Die ermittelten  $K_d$ -Werte

entsprechen zwar nicht denjenigen der einzelnen SH3-Domänen, aber sie liefern dennoch wertvolle Anhaltspunkte zur Einschätzung der relativen SH3-Bindungsstärken.

Vergleicht man die quantitativen Daten des ELISAs mit den semi-quantitativen Ergebnissen des Pull-Down-Assays und der FRET-Analyse, ergibt sich ein schlüssiges Gesamtbild, wobei es zwischen den Testsystemen auch wichtige Unterschiede gibt. Die SH3-Domänen sind in der Reihenfolge ihrer Affinitäten im jeweiligen Assay in Tab. 4.1 aufgelistet.

**Tabelle 4.1 Gegenüberstellung der Sam68-bindenden SH3-Domänen gemäss der relativen Affinitäten in den drei verschiedenen Interaktions-Assays**

ELISA	Pull-Down	FRET
Yes	Yes	Fyn
Src	Src	Hck
Lyn	Fyn	Yes
p85 $\alpha$	OSF	Lyn
OSF	Lyn	Src
Hck	Hck	p85 $\alpha$
Nck1#2	Nck1#2	OSF
Fyn	IS2#3	IS2#3
IS2#3	p85 $\alpha$	Nck1#2

Der Übersicht kann man entnehmen, dass Src-Kinasen, insbesondere Yes, in allen Assays die drei Top-Binder darstellen. Fyn war zwar im Phagen-ELISA nur ein schwacher Binder, wies aber eine starke Bindung im Pull-Down-Assay und in der FRET-Analyse auf, was wahrscheinlich dadurch zu erklären ist, dass es nur gut an posttranslational modifiziertes Sam68 aus eukaryotischen Zellen bindet. Nck1#2 und IS2#3 gehörten bei allen Tests zu den schwächsten Bindern. Warum Hck beim FRET-Assay heraussticht, ist unklar. Es muss aber angemerkt werden, dass der FRET-Assay nur bedingt quantitative Aussagen zulässt. Die FRET-Effizienz ist nämlich u. a. von der räumlichen Orientierung der CFP- und YFP-Fluorophore zueinander abhängig ( $\kappa^2$  in Gleichung 3.1), die in einem gewissen Mass von der Struktur der Fusionsproteine beeinflusst wird.

#### **4.1.3 Analyse der Selektivität von Sam68-SH3-Interaktionen**

Für einige wenige SH3-Domänen war in der Literatur bereits gezeigt, dass sie mit mehreren Sam68-Px-Motiven interagieren (vgl. Tabelle 1.4). Systematische Untersuchungen, an welche Motive einzelne SH3-Domänen binden, wurden bislang allerdings nicht durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher für die neun ausgewählten SH3-Domänen eine umfassende Untersuchung des Bindungsprofils vorgenommen. Dazu wurden 18 - 20 AS lange Peptide (siehe Tab. 3.2), welche die sieben einzelnen Px-Motive enthalten, als GST-Fusionen hergestellt und ebenfalls mit dem Phagen-ELISA auf SH3-Domänen-Bindung hin untersucht. Dabei ergab sich, dass nur die Motive P0, P3, P4 und P5 mit SH3-Domänen

interagieren, während keine der getesteten SH3-Domänen an P1, P2 oder P6 band (siehe Tab. 3.3).

Die Sam68-bindenden SH3-Domänen, die von den Src-Kinasen abgeleitet sind, weisen alle ein sehr ähnliches Bindeprofil auf, was aufgrund ihrer hohen Homologie verständlich ist. Sie interagieren mit allen vier relevanten Motiven, wobei P5 jeweils die Bindungsstelle mit der höchsten Affinität darstellt. Die restlichen getesteten SH3-Domänen unterscheiden sich in ihrem Bindeprofil stärker voneinander, wobei auffällig ist, dass keines dieser Protein eine messbare Bindung an P5 aufweist, so dass dieses Motiv wahrscheinlich eine spezifische Andockstelle für die Src-Kinasen ist.

Betrachtet man die nicht bindenden Px-Motive, fällt zunächst auf, dass P1 und P2 nur das Kern-PxxP-Motiv ohne die oft zu findende zusätzliche basische Aminosäure aufweisen, so dass es möglich ist, dass sie keine SH3-Bindestellen darstellen. P6 gehört zwar zur kanonischen Klasse 1K, befindet sich aber mitten in der Kernlokalisationsdomäne, so dass unter physiologischen Bedingungen die Bindestelle möglicherweise durch Kernimport-Faktoren blockiert ist. Wahrscheinlich hat sich daher im Laufe der Evolution keine SH3-bindende Funktion entwickelt. Die hier ermittelten Daten reichen allerdings als Beweis dafür nicht aus, dass die drei Motive keine SH3-Bindestellen darstellen. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass einige der nicht näher charakterisierten SH3-Domänen doch binden, zum anderen kann es sein, dass die Peptide im Gegensatz zum Volllänge-Sam68 nicht alle Determinanten zur Bindung enthalten.

Vergleicht man die direkt gewonnenen Daten zur Px-Selektivität mit den *in vivo*-Interaktions-Analysen (FRET-Assay) der Sam68-Varianten mit mutierten Px-Motiven (siehe Abb. 3.18), ergibt sich ein bemerkenswert konsistentes Bild. Bei Yes-SH3 und Fyn-SH3, die laut Phagen-ELISA jeweils am stärksten an P5 binden, wird nur bei Sam68 $\Delta$ P5 eine drastische Abnahme des FRET-Signals und damit der Interaktion beobachtet. Entsprechend dem *in vitro* ermittelten Bindeprofil hatte die Mutation einzelner Motive keinen Einfluss auf die Bindung von OSF-SH3 (vergleichbare Bindung an P0 und P3), während p85 $\alpha$ -SH3, das stärker an P0 bindet, einen niedrigeren FRET-Effekt bei der Mutante Sam68 $\Delta$ P0 zeigte. Die Sam68 $\Delta$ P0345-Mutante, bei der die vier relevanten Px-Motive gemeinsam inaktiviert sind, führte bei allen getesteten SH3-Domänen erwartungsgemäss zur stärksten Reduktion des FRET-Signals bis auf das Hintergrundniveau.

Auch die publizierten Daten stimmen mit den hier ermittelten überein, indes sie nur Interaktionen mit P0, P3, P4 und P5 beschreiben (vgl. Tab. 1.4)\*. Lediglich FINAN *et. al.* berichten über eine Interaktion der Src-SH3-Domäne mit P1 [71]. Die Autoren führten Kompetitions-Experimente der Sam68-Src-SH3-Wechselwirkung mit den einzelnen Peptiden (nur P0 bis P5) durch, wobei sich P0, P1 und P5 als wirksam erwiesen. Die Peptide wurden allerdings in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt, so dass eine unspezifische Bindung an die Src-SH3-Domäne nicht ausgeschlossen werden kann, die zu einer Fehleinschätzung der Bedeutung von P1 führte.

Insgesamt ergibt sich also ein konsistentes Bild, gemäss dem ausschliesslich die Motive P0, P3, P4 und P5 als SH3-Andockstellen fungieren. P1, P2 und P6 sind also entweder funktionslos oder dienen als Bindestellen für andere Typen von Prolin-Erkennungsdomänen.

Detaillierte Mutagenese-Experimente mit den vier Px-Motiven gaben Aufschluss über die für die Bindung essentiellen Aminosäuren. Bei P0 wird interessanterweise die Deletion eines der beiden Proline von manchen SH3-Domänen toleriert, während das C-terminal gelegene Arginin unbedingt nötig ist. Bei P4, das ein N-terminales Arginin aufweist, führt dessen Austausch nur zu einer geringen Beeinträchtigung der Bindung, während beide Proline essentiell sind. Die Motive P3 und P5, die auf den ersten Blick recht ähnlich scheinen, da sie mit fünf bzw. sechs Prolinen deutlich komplexer sind, unterscheiden sich bezüglich ihrer Bindungseigenschaften stark voneinander. Bei P3 sind anscheinend alle fünf Proline direkt an der Bindung beteiligt, da erst der vollständige Austausch zu Alanin zum Ausbleiben der SH3-Bindung führt. Bei P5 hingegen, das sich in drei separate, ineinandergeschachtelte PxxP-Motive zerlegen lässt (**PxxP****PP****PxxP**), ist nur das mittlere Motiv (hier in rot) ausschlaggebend, wobei es bereits hinreichend ist, dessen erstes Prolin durch Alanin zu ersetzen, um die Bindung, auch für die hoch-affinen Src-Kinasen, vollständig zu inhibieren. Die oben bereits geschilderten *in vivo*-Interaktionsstudien mit Minimal-Mutanten, die auf diesen Erkenntnissen aufbauen, belegen, dass die durchgeführte Feinkartierung zuverlässige Ergebnisse lieferte.

Zusammenfassend wurde also die Selektivität der SH3-Domänen für die einzelnen Sam68-Px-Motive detailliert aufgeklärt. Dadurch konnte mit einem rationalen Konzept die Sam68 $\Delta$ P0345-Mutante erstellt werden, die bei minimaler Struktur-Beeinträchtigung (vgl. auch Strukturvorhersage in Abb. 3.15) keine SH3-Interaktionen mehr eingeht. Diese Mutante stellt somit ein wichtiges Werkzeug zur Analyse SH3-vermittelter Funktionen von Sam68 dar.

\* Die Nomenklatur der Px-Motive ist in der Literatur nicht einheitlich – die Bezeichnungen der Tabelle wurden an das hier verwendete System angepasst, das sich an demjenigen von LUKONG & RICHARD orientiert [56].



#### **4.1.4 Implikationen von Sam68-SH3-Interaktionen in zellulären Prozessen**

Wurden in der Literatur bereits mehrere Proteine beschrieben, die SH3-Domänen-vermittelt an Sam68 binden, so wird das Repertoire an Interaktionspartnern durch die oben geschilderten Ergebnisse noch einmal deutlich erweitert. Hinzu kommen viele weitere Proteine, die z. B. über SH2-Domänen oder durch Wechselwirkung mit der KH-Domäne an Sam68 binden. Es stellt sich also die Frage, welche biologische Funktion sich hinter einem derart breiten Bindungsprofil verbirgt.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass es sich bei Sam68 um ein **Scaffold-Protein** handelt. Scaffold-Proteine (zur Übersicht siehe ZEKE *et al.* [190]) besitzen i. d. R. keine enzymatische Aktivität, spielen aber dennoch eine wichtige Rolle als Knotenpunkte im Rahmen von Signaltransduktionsnetzwerken, wo sie andere Proteine zu Signalkomplexen assemblieren («Signalosomen»). Entsprechend zeichnen sie sich durch multiple Bindungsstellen für Komponenten verschiedener Signalwege aus. Mechanistisch gesehen erhöhen sie zum einen die Effizienz und die Spezifität der Signalweiterleitung durch Aggregation bestimmter Komponenten, zum anderen kombinieren sie Proteine, die mehreren Signalwegen gemein sind, zu definierten Komplexen mit speziellen Funktionen.

Da es alle Kriterien erfüllt, sei an dieser Stelle vorgeschlagen, Sam68 als *bona fide* Scaffold-Protein zu betrachten. Die Vielzahl beobachteter Interaktionspartner und die Breite der verschiedenen Prozesse, für die eine Beteiligung von Sam68 gezeigt wurde, stützen diese Sichtweise, gemäss der es sich um ein Regulatorprotein zur Organisation verschiedener Signaltransduktionskomponenten handelt. Durch seine RNA-Bindungsfähigkeit wird darüber hinaus noch eine weitere Stufe der Komplexität erreicht, indem die Inkorporation von RNAs in solche Signalkomplexe erlaubt wird.

Beispielsweise wäre denkbar, dass die Aktivierung der verschiedenen Zelltyp-spezifischen Src-Kinasen stets über die Bindung an Sam68 gemeinsame Downstream-Signale induziert, die z. B. Mitogenese-fördernd in die Zellzyklusregulation eingreifen. Parallel dazu kann jede Src-Kinase die für ihren Zelltyp charakteristischen Signale weiterleiten.

Abschliessend soll noch näher auf diejenigen hoch-affinen SH3-Domänen eingegangen werden, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals als Sam68-Binder beschrieben wurden, nämlich Hck, Intersectin 2 und den Osteoclasten-stimulierenden Faktor 1. Zur Funktion der restlichen sechs detailliert untersuchten SH3-Proteine (Fyn, Lyn, Nck1, p85 $\alpha$ , Src und Yes) sei auf die jeweilige Literatur verwiesen [75,72,102,85].

- *Hematopoietic cell kinase* (Hck)

Hck gehört zur Familie der Src-Kinasen und wird in myeloiden Zellen, v. a. in Phagocyten, exprimiert. Es spielt dort eine wichtige Rolle bei der Regulation Actin-abhängiger Prozesse während der Phagocytose, wobei es auch eine Schnittstelle zur Signaltransduktion darstellt (zur Übersicht siehe GUIET *et al.* [191]). Die Interaktion mit Sam68 ist nicht überraschend, wenn man bedenkt, dass die meisten Mitglieder der SFKs bereits als Sam68-Binder beschrieben wurden. Sam68 dürfte hier als Adapter- bzw. Scaffold-Protein im Rahmen der Signaltransduktion tätig sein.

- Intersectin 2 (IS2)

Intersectin 1 und Intersectin 2 sind Proteine mit sehr hoher Homologie, die eine Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endocytose spielen [192]. Die Intersectine besitzen zahlreiche Domänen zur Interaktion mit anderen Proteinen, u. a. jeweils fünf SH3-Domänen. Man nimmt an, dass sie als Scaffold-Proteine zur Organisation von Komponenten der Endocytose-Maschinerie wichtig sind. Bei einigen Signaltransduktionswegen spielt die Endocytose eine wichtige Rolle (z. B. Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade) [193], so dass die Interaktion von Sam68 mit IS2 möglicherweise für die Quervernetzung beider Prozesse wichtig ist.

- Osteoclasten-stimulierender Faktor 1 (OSF)

Wie der Name sagt, spielt OSF eine wichtige Rolle bei der Osteoclasten-Differenzierung. Die Expression von OSF führt zur Sekretion eines bislang nicht identifizierten Faktors, der in Zellkultur die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Osteoclasten induziert [194]. Darüber hinaus interagiert OSF mit Src, was eine interessante Verbindung darstellt, wenn man bedenkt, dass Src-Knock-out-Mäuse schwere Knochendeformationen infolge eines Osteoclasten-Defekts aufweisen [122]. Die Interaktion von OSF mit Sam68 fügt sich hervorragend in das Bild eines Osteoclasten-spezifischen Signalwegs ein, der Src, OSF und Sam68 beinhaltet, weist doch die Sam68-Knock-out-Maus ebenfalls einen Osteoclastendefekt auf [121]. Möglicherweise stellt hier die fehlende Interaktion zwischen OSF und Sam68 die molekulare Basis für den beobachteten Knock-out-Phänotyp dar.

## 4.2 Sam68-SH3-Interaktionen im Rahmen der HIV-Replikation

Sam68 ist ein wichtiger zellulärer Cofaktor des HI-viralen RNA-Metabolismus, wobei der mechanistische Hintergrund nach wie vor unklar ist. Diskutiert wird eine Rolle beim CRM1-vermittelten Kern-Export Intron-haltiger viraler RNAs, bei deren 3'-Prozessierung, ihrer cytoplasmatischen Verwendung oder dem alternativen Spleissen (vgl. Abb. 1.6). In diesem Zusammenhang gibt es jedoch keine Untersuchungen dazu, inwieweit Sam68 über die Interaktion mit Signaltransduktionsproteinen reguliert wird.

Wegen der auffälligen Häufung von Prolin-reichen Motiven in der Sam68-Sequenz wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Wechselwirkung von Sam68 mit SH3-Domänen während der HIV-Replikation eine Rolle spielt (siehe 4.2.1). Darüber hinaus wurde ein SH3-basierter Inhibitor der HIV-Replikation entwickelt (siehe 4.2.2).

### 4.2.1 Keine Beteiligung von Sam68-SH3-Interaktionen an der HIV-Replikation

Basierend auf der detaillierten Charakterisierung der SH3-Bindestellen von Sam68 wurden wie oben erläutert Sam68-Mutanten hergestellt, bei denen die vier relevanten Px-Motive entweder einzeln (Sam68 $\Delta$ Px) oder gemeinsam (Sam68 $\Delta$ P0345) durch Alanin-Mutationen inaktiviert waren. Die Überexpression dieser Mutanten (siehe Abb. 3.18) zeigte im HIV-Replikations-Assay keine Auswirkungen – die Menge produzierter Virus-Partikel entsprach derjenigen bei Überexpression des unveränderten *sam68*-Gens bzw. dem Kontrollansatz ohne exogenes Sam68.

Das Ausbleiben eines positiven Effekts auf die HIV-Replikation bei Cotransfektion von Wildtyp-Sam68 steht zwar im Widerspruch zu den Daten von REDDY *et al.* [124], aber im Einklang mit anderen Veröffentlichungen [128,130] und weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe WAGNER [195,196]. REDDY *et al.* beobachteten die Sam68-vermittelte Verstärkung nicht nur bei Versuchen mit dem sehr artifiziellen CAT-RRE-Reportersystem, sondern weniger stark ausgeprägt auch bei einem Replikations-Assay mit einem proviralen Plasmid, bei dem allerdings das *rev*-Gen inaktiviert war und somit auf einem weiteren Plasmid eingebracht werden musste. Möglicherweise handelt es sich hierbei um den entscheidenden Unterschied zu dem in dieser Arbeit verwendeten Assay mit dem pNL4-3 Provirus mit intaktem *rev*: Hier unterliegt der zeitliche Ablauf des HIV-RNA-Metabolismus strikt der Kontrolle viraler Mechanismen, so dass Rev genau zur richtigen Zeit in der benötigten Menge produziert wird. Beim *rev*<sup>-</sup>-Provirus von REDDY ist dieser Ablauf vermutlich gestört, so dass eine erhöhte Menge von Sam68 – in welcher Weise auch immer – zu einer höheren Partikelproduktionsrate führt. Es wäre daher überaus interessant den Einfluss von Sam68 auf ein *rev*<sup>-</sup>- und ein *rev*<sup>+</sup>-Provirus parallel zu untersuchen, um diese Hypothese zu testen.

Wäre die Interaktion mit bestimmten SH3-Domänen eine wichtige Voraussetzung zur Wahrnehmung der Sam68-Funktion im Rahmen der HIV-Replikation, würde man bei der Überexpression der Sam68 $\Delta$ Px-Mutanten unter Umständen einen negativen Effekt erwarten. Das Ausbleiben eines solchen Phänotyps schließt eine Bedeutung der Px-Motive allerdings nicht aus. Zwar würde man vermuten, dass die Mutanten mit dem Wildtyp-Protein konkurrieren, aber sicher ist dies nicht. Eine gewisse Menge des endogenen funktionellen Sam68 könnte bereits ausreichen, um den korrekten Ablauf des RNA-Metabolismus sicherzustellen.

Aus diesem Grund wurde eine Strategie zum Knock-down des endogenen Sam68 verfolgt. Die Depletion mittels RNAi erwies sich als ungeeignet, da anscheinend der Metabolismus der Zellen in Mitleidenschaft gezogen wird [196]. Zwar würde man aufgrund der Existenz einer Sam68-Knock-out-Maus keine Probleme bei einem siRNA-vermittelten Knock-down erwarten, aber es kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass Sam68 in humanen Zellen doch essentiell ist. Wahrscheinlicher ist aber, dass Sam68 eine wichtige Rolle für das optimale Wachstum der verwendeten Zelllinien unter – unphysiologischen – Zellkulturbedingungen spielt. Entsprechend wurde beobachtet, dass die von REDDY zur Verfügung gestellten stabilen Sam68-Knock-down-Zelllinien deutlich langsamer proliferierten als Wildtyp-Zellen; auch die Expression von Kontrollgenen wie *gfp* war stark beeinträchtigt [196]. BUSÀ *et al.* beschreiben übereinstimmend mit diesen Daten nach RNAi-vermittelter Depletion von Sam68 eine Reduktion der Proliferationsrate auch für eine Prostatacarcinom-Zelllinie [109]. Hinzu kommt das generelle Risiko von *off-target*-Effekten beim Einsatz von siRNAs.

Daher wurde stattdessen der Weg eines funktionellen Sam68-Knock-downs mittels der Sam68 $\Delta$ C-Mutante beschritten. Dieser Mutante fehlt das C-terminale Kernlokalisierungssignal, was eine dominant negative Wirkung auf die HIV-Replikation zur Folge hat [124]. Verschiedene Mechanismen wurden vorgeschlagen, um diesen Effekt zu erklären: Das fehllokalisierte Protein hält entweder Rev [124] oder endogenes Volllänge-Sam68 im Cytoplasma zurück [128]; eventuell verhindert es auch die Bindung des Poly-A-Bindeproteins 1 (PABP1) an die virale RNA, was die Translationseffizienz senkt [137]. Die Domäne 269-321, die u.a. das Motiv P3 enthält, ist für die Hemmung durch Sam68 $\Delta$ C essentiell, weshalb ZHANG *et al.* spekulierten [128], dass entweder die Interaktion mit SH3-Domänen-haltigen-Proteinen wie Sik/BRK [64,131] oder die Methylierung der RG-reichen Sequenzen durch PRMT1 [91] für den Mechanismus von Bedeutung ist.

Die Überexpression von Sam68 $\Delta$ C in Anwesenheit des Provirus führte in Übereinstimmung mit den publizierten Daten zu einer drastischen Abnahme der Partikelproduktion bis an die Nachweisgrenze (siehe Abb. 3.20). Die Co-Expression von Wildtyp-*sam68* konnte die Virus-Replikation bis zu einem gewissen Grad (knapp 40 %) wiederherstellen, was beweist, dass

der Knock-down Sam68-spezifisch ist. Allerdings waren auch die Sam68 $\Delta$ Px-Mutanten in der Lage, den dominant negativen Effekt von Sam68 $\Delta$ C in gleichem Umfang zu kompensieren, was wiederum gegen eine essentielle Rolle von Sam68-SH3-Interaktionen während der HIV-Replikation spricht.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die hier durchgeführten Versuche keinen Hinweis darauf erbrachten, dass die Wechselwirkung von Sam68 mit SH3-Domänen-haltigen Proteinen für die Modulation des RNA-Metabolismus von HIV relevant ist.

Die Ergebnisse stellen jedoch keinen endgültigen Beweis für diesen Sachverhalt dar. Es ist durchaus vorstellbar, dass der Regulation von Sam68 über SH3-Domänen-haltige Proteine in T-Zellen oder im Rahmen der sehr viel komplexeren Situation einer HIV-Infektion im Patienten doch eine Bedeutung zukommt. Aufgrund der Vielzahl an Möglichkeiten ist eine systematische Untersuchung jedoch schwierig.

#### **4.2.2 SH3-basierte Inhibition der HIV-Replikation**

Als für die HIV-Replikation essentielles Protein stellt Sam68 ein hochinteressantes Angriffsziel für potentielle therapeutische HIV-Gentherapie-Ansätze dar [34]. Dabei ist zum einen von Bedeutung, dass es sich als zelluläres Protein nicht wie die viralen Pendants durch Mutationen dem Zugriff durch das Therapeutikum entziehen kann. Zum anderen zeigen die Untersuchungen der Sam68-Knock-out-Maus, dass das Protein nicht essentiell ist, so dass seine Beeinträchtigung unproblematisch sein dürfte. Die bis dato berichteten Knock-out-Phänotypen beziehen sich darüber hinaus auf Zelltypen, die für die HIV-Replikation irrelevant sind (Osteoclasten, Neuronen, Keimbahnzellen). Dennoch können Nebenwirkungen nicht von vornherein ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob der Einsatz einer Sam68-bindenden SH3-Domäne als trans-dominanter Inhibitor der HIV-Replikation möglich ist. Wie oben beschrieben spielt die Wechselwirkung von Sam68 mit SH3-Domänen-haltigen Proteinen allerdings keine Rolle beim viralen RNA-Metabolismus, weshalb primär nicht zu erwarten wäre, dass die Blockade einer solchen Interaktion durch ein trans-dominantes Protein einen antiviralen Effekt hat. Es sind jedoch weitere Mechanismen denkbar, wie eine SH3-Domäne dennoch eine derartige trans-dominante Wirkung entfalten könnte. So besteht die Möglichkeit, dass die feste – idealerweise irreversible – Bindung einer (isolierten) SH3-Domäne an Sam68 die Komplexbildung mit weiteren Proteinen stört oder sogar verhindert. Bedenkt man obige Interpretation, nach der Sam68 als Scaffold-Protein gerade diese Funktion der Assemblierung anderer Proteine, u. a. auch Rev, wahrnimmt, wäre dies eine empfindliche Störung.

Dementsprechend wurde zunächst vom höchst-affinen Sam68-Binder, der Yes-SH3-Domäne, ausgehend eine Variante mit noch höherer Affinität (»Yes-opt«) generiert (Diplomarbeit von Maria KELLNER [173]). Ein weiterer Vorteil dieser "Affinitätsreifung" neben der erhöhten Bindungsstärke besteht darin, dass eine Zunahme der Spezifität zu erwarten ist [174], was potentielle *off-target*-Effekte minimiert – schliesslich bindet die SH3-Domäne von Yes auch andere Proteine als Sam68. Jedoch ergab eine detaillierte Charakterisierung von Yes-opt in der vorliegenden Arbeit interessanterweise, dass die Domäne ein breiteres Bindungsprofil in Bezug auf die Sam68-Interaktion aufwies, indem eine zusätzliche Bindung an P1, P2 und P6 stattfand. Die Affinität des Yes-opt-tragenden Phagen zu Sam68 wird daher durch drei weitere potentielle Wechselwirkungen (höhere Valenz) noch weiter verstärkt. Dadurch hat sich diese Yes-SH3-Mutante wahrscheinlich im Bio-Panning gegenüber den anderen Varianten durchgesetzt. Welche Auswirkungen diese veränderte Selektivität in Bezug auf die Bindung anderer Zielproteine hat, kann nicht vorhergesagt werden. Eine einfache Untersuchung mittels eines Pull-Down-Assays ergab ein vergleichbares Muster von mehreren präzipitierten Proteinen wie beim Einsatz der Wildtyp-Yes-SH3-Domäne (siehe Abb. 3.20), was höchstwahrscheinlich auf die Co-Komplex-Bildung dieser Proteine mit Sam68 zurückzuführen sein dürfte.

Die Überexpression der isolierten Yes- und Yes-opt-SH3-Domänen als Fusionen mit YFP führte zu einer Dosis-abhängigen Inhibition der Partikel-Produktion im HIV-Replikations-Assay, während eine Kontroll-SH3-Domäne (RasGAP) erwartungsgemäss keinen Einfluss zeigte (vgl. Abb. 3.23). Es stellt sich jedoch die Frage, ob der Effekt spezifisch für die HIV-Replikation ist oder durch einen generellen negativen Effekt der SH3-Domänen auf den Zellmetabolismus verursacht wurde, z. B. indem die SH3-Domänen in Signalwege zur Zellzyklus- oder Apoptose-Regulation eingreifen. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein analoger Test mit dem Kontrollkonstrukt synGagPol anstelle des Provirus durchgeführt. Dadurch wird eine maximale Vergleichbarkeit gewährleistet, weil der Replikations-Assay inkl. des Nachweises produzierter Virus-ähnlicher Partikel in genau der gleichen Weise durchgeführt werden kann. Der entscheidende Unterschied liegt darin, dass das codon-optimierte *syngagpol* unter der Kontrolle eines CMV-Promotors und einer BGH-Polyadenylierungsstelle sowie ohne regulatorische Sequenzen des HI-Virus exprimiert wird, so dass die mRNA konstitutiv und Rev/CRM1-unabhängig [197] und damit auch Sam68-unabhängig aus dem Zellkern exportiert wird. Bei diesem Kontrollversuch konnte kein Einfluss der Yes- und Yes-opt-SH3-Domänen auf die Partikel-Produktionsmenge festgestellt werden. Der Vergleich zeigt also, dass die beobachtete Hemmung der HIV-Replikation durch Yes und Yes-opt tatsächlich auf einer Störung des viralen RNA-Metabolismus beruht (vgl.

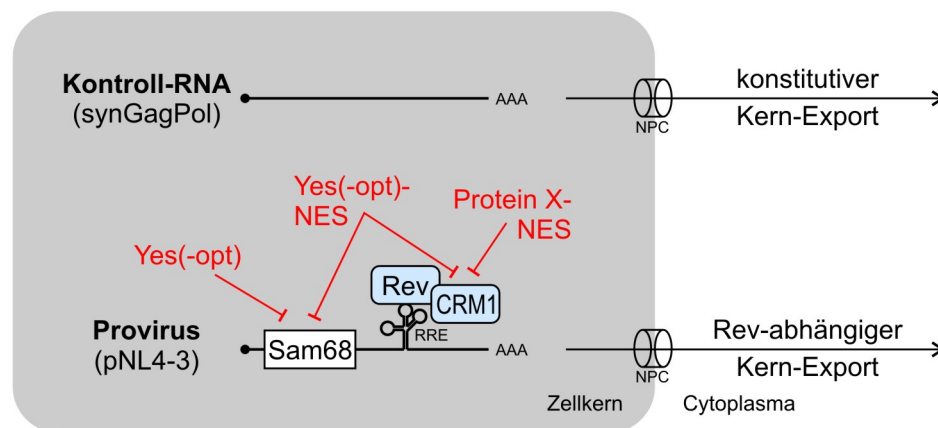
Abb. 4.1). Die Beeinflussung der Sam68-Funktion in diesem Zusammenhang dürfte höchstwahrscheinlich die mechanistische Grundlage für den beobachteten Effekt darstellen. Die Yes-opt-SH3-Domäne war in den durchgeführten Versuchen nur marginal effektiver als die Wildtyp-Domäne, was darauf hindeutet, dass die Affinität der Yes-SH3-Domäne zu Sam68 bereits hoch genug zur Störung des Komplexgleichgewichtes ist. Im Hinblick auf eine gentherapeutische Anwendung wäre es daher sinnvoller, die Wildtyp-Yes-SH3-Domäne einzusetzen, weil hier keine Immunantwort gegen das Transgen zu erwarten ist.

Als nächste Stufe sollte getestet werden, ob die Yes-(opt-)SH3-Domänen als Fusionen mit einer Kern-Export-Sequenz (NES) in der Lage sind, die subzelluläre Lokalisation von Sam68 zu verändern. Dieser Mechanismus wird für den ausgeprägten dominant negativen Effekt der Sam68 $\Delta$ C-Mutante ohne Kern-Lokalisations-Signal (NLS) diskutiert; endogenes Sam68 könnte mit der Mutante oligomerisieren und so im Cytoplasma zurückgehalten werden [129]. Unklar ist jedoch, warum nicht die NLS des Wildtyp-Proteins den gesamten Komplex in den Kern verlagert. Wird Sam68 ins Cytoplasma transportiert, steht es jedenfalls nicht mehr im Kern für seine Funktion im Rahmen des HI-viralen RNA-Metabolismus zur Verfügung.

Die SH3-Domänen wurden daher mit der NES des Proteinkinase-Inhibitors (PKI) fusioniert, die eines der stärksten bekannten CRM1-abhängigen Exportsignale darstellt [176]. Lokalisationsstudien der YFP-SH3-NES-Fusionsproteine ergaben aber unerwarteterweise, dass die Konstrukte im Zellkern angereichert sind (siehe Abb. 3.21). Dies könnte durch eine Wechselwirkung mit dem nukleären Sam68 erklärt werden, wenn man annimmt, dass der Sam68-NLS-vermittelte Import den Export des Komplexes überwiegt. Eine derartige Gleichgewichtslage wurde von WEN *et al.* für ein Fusionsprotein gezeigt, das gleichzeitig die NLS des grossen SV40T-Antigens und die PKI-NES enthält [175]. Da eine Verlagerung geringer Mengen der Sam68-SH3-NES-Komplexe ins Cytoplasma dennoch möglich ist, wurde mit Yes-NES und Yes-opt-NES ebenfalls der HIV-Replikations-Assay durchgeführt. Zwar erwiesen sich beide Proteine als äusserst effektive Inhibitoren der Partikel-Produktion, aber die Kontrollproteine YFP-NES und YFP-RasGAP-NES waren gleichermassen inhibitorisch (Abb. 3.26). Daraus folgt, dass das NES-Peptid für sich alleine bereits eine antivirale Wirkung zeigt. Durch Normierung der Daten von YFP-Yes-(opt)NES auf die zugehörigen YFP-NES-Werte wurde der Einfluss der NES ausgeglichen und wieder der inhibitorische Effekt der SH3-Domäne beobachtet, der beim Kontrollprotein YFP-RasGAP-NES entsprechend ausblieb. Die beiden antiviralen Effekte der Yes-(opt-)SH3-Domäne und der NES sind also additiv (vgl. Abb. 4.1).

Die universelle Wirkung der NES ist also Sam68-unabhängig. Ein wahrscheinlicher Mechanismus besteht in einer Hemmung des Rev/RRE-Exports durch Konkurrenz der YFP-(SH3-)NES-Proteine um die CRM1-abhängige Exportmaschinerie. Entsprechend wurde auch

eine Hemmung des Kernexports einiger zellulärer RNAs, die CRM1-abhängig exportiert werden, durch ein Fusionsprotein aus der PKI-NES und humanem Serumalbumin beobachtet [198]. Diese allgemeine Beeinflussung der zellulären Exportmaschinerie disqualifiziert die SH3-NES-Proteine allerdings als antivirale Proteine, da ausgeprägte Nebeneffekte zu erwarten sind. Interessant wäre die Untersuchung der Yes(-opt)-SH3-Domänen mit anderen, CRM1-unabhängigen Kern-Export-Sequenzen, wie der KNS-Sequenz von hnRNP K [176]. Möglicherweise gelingt damit die Relokalisation von Sam68 ins Cytoplasma ohne eine generelle Beeinflussung des RNA-Exports.



**Abb. 4.1 Modell der SH3- bzw. NES-vermittelten Inhibition des HI-viralen RNA-Metabolismus**

Im Gegensatz zu typischen mRNAs, die wie das zur Kontrolle betrachtete synGagPol Rev-unabhängig aus dem Zellkern exportiert werden, ist der Kernexport Intron-haltiger viraler RNAs vom RRE/Rev/CRM1-System abhängig. Auch Sam68 spielt eine entscheidende Rolle im viralen RNA-Metabolismus.

Die Yes(-opt)-SH3-Domänen blockieren als spezifische Sam68-Binder dessen Funktion, während NES-haltige Proteine wahrscheinlich die Funktion von CRM1 blockieren. Yes(-opt)-NES inhibiert entsprechend beide Prozesse unabhängig voneinander.

Die Beobachtung, dass Proteine mit PKI-NES den Export der Rev-RRE-Komplexe inhibieren, könnte dennoch für die HIV-Gentherapie interessant sein. Fügt man das kurze NES-Peptid (10 AS) an etablierte Inhibitoren wie trans-dominante Gag-Varianten [199] oder RevM10 [200] an, könnte deren Wirkung eventuell drastisch erhöht werden. Um Nebeneffekte durch die Inhibition des Exports zellulärer Komponenten zu umgehen, wäre allerdings eine konditionale Expression des Transgen-NES-Konjugats unter Kontrolle eines Tat-induzierbaren Promotors ratsam [201].

Insgesamt betrachtet erwiesen sich also die Sam68-bindende SH3-Domäne von Yes sowie deren höher-affine Variante Yes-opt als gute Inhibitoren der HIV-Replikation. Die Wirkung beruht höchstwahrscheinlich auf einer Störung des Komplexgleichgewichts von Sam68 mit anderen Proteinen, so dass es seine Funktion im Rahmen des HI-viralen RNA-Metabolismus nicht mehr wahrnehmen kann. Als kleines Protein zellulären Ursprungs könnte sich die Yes-SH3-Domäne gut als Kandidat für eine HIV-Gentherapie eignen.



### 4.3 Ausblick

Betrachtet man die zahlreichen Publikationen, die – teils widersprüchliche – Funktionen von Sam68 im Rahmen verschiedenster Prozesse beschreiben, stellt sich die Frage nach einem Konzept, das diese Funktions-Vielfalt erklären kann. Die in 4.1 dargelegte Sichtweise, nach der Sam68 als Scaffold-Protein aufzufassen ist, das in Abhängigkeit vom Muster posttranslationaler Modifikationen, von der Zelltyp-spezifischen Ausstattung mit verschiedenen Signaltransduktionsproteinen sowie vom Signalzustand der Zelle unterschiedliche Proteine zu definierten Komplexen mit distinkten Funktionen aggregiert, könnte als Basis für das genaue Verständnis der Biologie von Sam68 dienen.

Daher wäre ein umfassender Überblick möglicher Sam68-Wechselwirkungen überaus interessant. Ähnliche Analysen wie in dieser Arbeit für die SH3-Domänen sollten daher auch für andere Bindungspartner wie die SH2- oder WW-Domänen durchgeführt werden. Wertvolle Informationen liessen sich auch durch die Charakterisierung der Zusammensetzung von Sam68-Multiproteinkomplexen aus verschiedenen Zellen unter verschiedenen Bedingungen erhalten, z. B. durch Immunpräzipitation solcher Komplexe gefolgt von der massenspektrometrischen Identifizierung einzelner Komponenten, wie kürzlich von HUOT *et al.* berichtet [202]. Das Augenmerk sollte dabei insbesondere auch auf die Identität der im Komplex enthaltenen RNAs gerichtet sein.

Ein tieferes Verständnis der Zusammensetzung und Dynamik von Sam68-Multiproteinkomplexen dürfte darüber hinaus entscheidend sein, um die nach wie vor umstrittenen Detailfunktionen von Sam68 im Rahmen der HIV-Replikation zu begreifen. Ausserdem dürfte sich daraus die mechanistische Grundlage für die in dieser Arbeit gezeigte antivirale Wirkung der isolierten Sam68-bindenden SH3-Domänen Yes- und Yes-opt ergeben. Höchstwahrscheinlich beruht der Effekt auf einer Störung des Komplexbildungsgleichgewichts von Sam68 mit für die HI-virale Replikation essentiellen Komponenten. In diesem Zusammenhang wäre auch die Suche nach Chemotherapeutika sehr interessant, die eine analoge Wirkung entfalten, da solche Substanzen viel schneller auf eine potentielle klinische Anwendung hin untersucht werden können als gentherapeutische Kandidaten. Im Hinblick auf derartige Anwendungen ist es überaus wichtig die Wirkungsweise der dominant negativen SH3-Domänen im Detail zu verstehen, um das etwaige Auftreten von Nebenwirkungen besser beurteilen zu können. Ein wichtiges Werkzeug für diese Untersuchungen wären Zelllinien, welche die inhibitorischen SH3-Domänen stabil exprimieren. Unabhängig davon sollte auch der im Rahmen der Arbeit beobachtete Sam68-unabhängige antivirale Effekt der Kernexportsequenz mechanistisch untersucht werden, da er das Potential bietet, bereits etablierte Transgene in ihrer Wirkung noch zu verstärken.

## 5. Anhang

### 5.1 Abkürzungsverzeichnis

Soweit nicht anders verzeichnet, folgen die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen den Empfehlungen des Duden [203], dem Gold Book der IUPAC [204] (insbesondere physikalische Grössen und Einheiten) und dem White Book der JCBN [205] (insbesondere Abkürzungen der Nucleotide und Aminosäuren).

Amp	Ampicillin	HTLV	Humanes T-Zell-Leukämievirus
AK	Antikörper	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ATTC	<i>American Type Culture Collection</i>	IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
BGH	<i>Bovine growth hormone</i>	IPTG	Isopropylthiogalactosid
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>	JCBN	<i>Joint Commission on Biochemical Nomenclature</i>
BP	Bandpass-Filter	Kan	Kanamycin
BSA	Bovines Serumalbumin	Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase	ODx	Optische Dichte bei x nm
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>	OSF	Osteoclasten stimulierender Faktor
cfu	<i>Colony forming unit</i> , Kolonie-bildende Einheit	PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese
CIP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
CMV	Cytomegalie-Virus	Phage	Bakteriophage
CTE	<i>Constitutive transport element</i>	PI3	Phosphatidyl-inositol-3-phosphat
DMEM	<i>DULBECCO'S minimal essential medium</i>	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid	PMT	<i>Photomultiplier tube</i>
EDTA	Ethylendiamin-N-N,N',N'-tetraacetat	<i>pol</i>	Gene der retroviralen Enzyme
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	RSV	Rous Sarkom-Virus
EIAV	Virus der equinen infektiösen Anämie	RRE	<i>Rev-responsive element</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	RT	Raumtemperatur
<i>env</i>	<i>envelope</i> , Hüllprotein-Gen	Sam68	<i>Src-associated in mitosis, 68 kDa</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum	SH2 / SH3	<i>Src-homology 2 / 3 domain</i>
FITC	Fluorescein-isothiocyanat	SFK	Src-Familie der nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
FRET	<i>FÖRSTER resonance energy transfer</i>	SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>	SSC	<i>Side scatter</i>
<i>gag</i>	Gene der Gruppen-spezifischen Antigene	T4-PNK	Polynucleotid-Kinase aus dem Bakteriophagen T4
GAP	GTPase-aktivierendes Protein	TDLB	<i>Triple detergent lysis buffer</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>	TMB	Tetramethyl-Benzidin
GSH	Glutathion (reduziert)	ÜN	Über Nacht
GST	Glutathion-S-Transferase	ÜS	Überstand
HSC	Hämatopoetische Stammzellen	UTR	<i>Untranslated region</i>
HeBS	<i>HEPES-buffered saline</i>	YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus		

Definition: Die Begriffe *in vitro* und *in vivo* werden im biochemischen Sinn gebraucht, nicht im zellbiologischen/immunologischen (vgl. [206]).

*in vitro* in zellfreien Systemen

*in vivo* in zellulären Systemen, insb. in eukaryotischen Zellkulturen

## 5.2 DNA-Konstrukte

### 5.2.1 Oligonukleotide

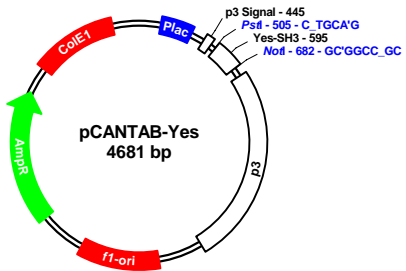
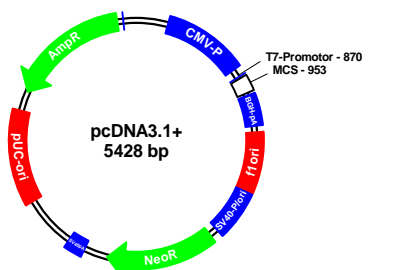
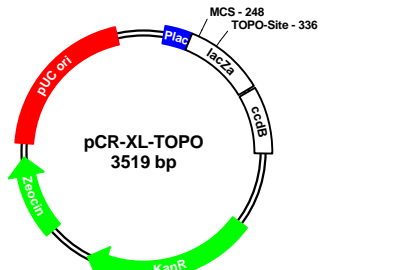
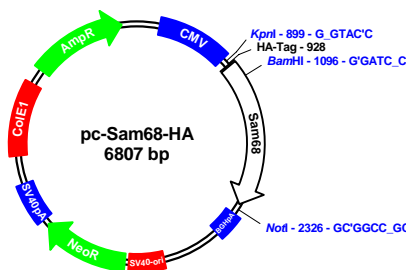
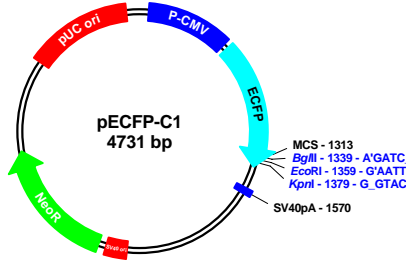
Oligonucleotide für PCR und Sequenzierung:

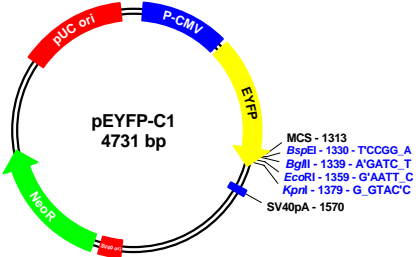
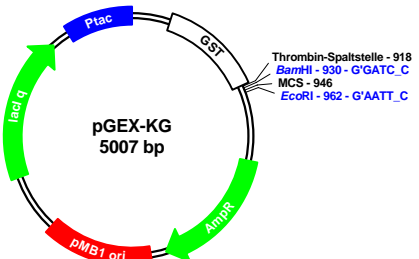
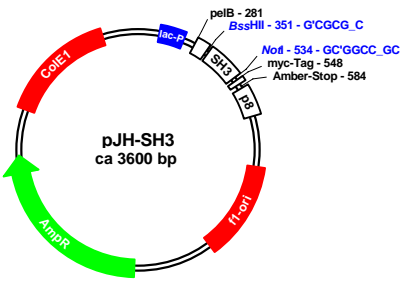
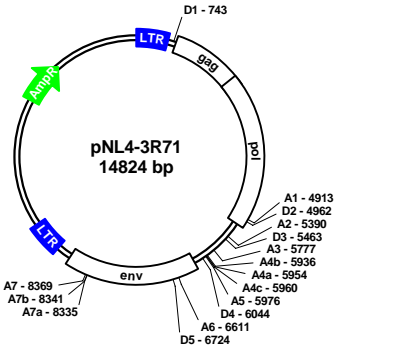
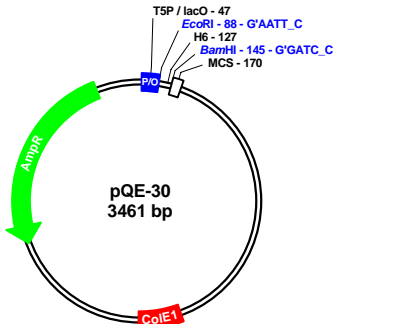
Name	Sequenz	Länge / bp	Tm / °C
ECFP 1074 fwd	CATCAGCCACAACGTCTATATCACC	25	62,9
ExFP 1255 fwd	GATCACATGGTCCTGC	16	54,0
ExFP 1266 fwd	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG	22	65,0
ExFP 548 fwd	GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGG	24	61,3
P0-KO-opt fwd	GCCTCACGCGTCCCGGGGAGGCG	23	61,4
P0-KO-opt rev	CGGGACGCGTGAGGCAGCGGCG	22	60,5
P3-KO-opt fwd	GCTGCTCCAGCAGCTGTTGCCAGGGGCCGTGGTG	34	62,4
P3-KO-opt rev	CAACAGCTGCTGGAGCAGCTGCAGCTCCCCGGC	33	61,7
P4-KO-opt fwd	GGCGTGGCACCCCCACCTACTGTGAG	26	61,6
P4-KO-opt rev	GGGGGTGCCACGCTCGAGTCACAG	25	60,0
P5-KO-opt fwd	GATACCTTTGGCTCCACCTCCTGCACCAG	29	62,0
P5-KO-opt rev	GGAGGTGGAGCCAAAGGTATCCTCTGGATGCCC	33	61,5
pc31 fwd	CTATATAAGCAGAGCTCTCTGGC	23	59,5
pc31 rev	GAGCTCTAGCATTTAGGTGACAC	23	59,8
pCANTAB fwd	CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC	24	51,6
pGEX-3'	GCGGGAGCTGCATGTGTGACAGG	23	69,9
pGEX-5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	23	69,6
pJH-fwd	CCTATTGCCTACGGCAGCC	19	62,4
pQE30-3'	GGCAACCGAGCGTTCTGAAC	20	62,6
pQE30-5'	CAATTGTGAGCGGATAACAATTTC	24	56,2
Sam68 488 fwd	CTGAAAGAGCGAGTGCTGATACC	23	62,2
Sam68 608 rev	CTCTTCCTCCTTGGCTTTGTCTCTC	25	62,6
Sam68 BclI fwd	ATCATCTGATCAATGCAGCGCCGGGACGACCC	32	61,1
Sam68 Eco fwd	GAGGAATTCCATGCAGCGCCGGGAC	25	64,2
Sam68 Eco rev	GATGAATTCTCATTAATAACGTCCATATGGGTGCTCT	37	72,5
Sam68 Kpn rev	GCGGTACCTTAATAACGTCCATATGGGTGCTCT	33	60,3
Sam68Δ410 Xho rev	ATGCCTCGAGTTATTATAAGAATCTTGAACCTCCCCATGTC	42	62,3
SH3-029 Bam fwd	CATGGATCCACCATCTTTGTGCGCC	25	54,8
SH3-029 Eco oS rev	ATGGAATTCATCTGCTGGTGCAACATAG	28	57,1
SH3-029 Eco rev	ATGGAATTCCTTAATCTGCTGGTGCAACATAG	31	57,1
SH3-031 Bam fwd	CATGGATCCACCACCTTTGTTGCC	25	54,5
SH3-031 Eco rev	ATGGAATTCCTTAATCGGATGGTGCAACATAG	31	56,9
SH3-188 Bam fwd	CATGGATCCCGTCGTGTTCTGTGCAATTC	28	58,4
SH3-188 Eco oS rev	ATGGAATTCACCGACTTCTTCGACCAAATC	30	58,1
SH3-188 Eco rev	ATGGAATTCCTTAACCGACTTCTTCGACCAAATC	33	58,1
SH3-206 Bam fwd	CATGGATCCAAAGTTTCCGTGCCCTGTAC	30	58,2
SH3-206 Eco rev	ATGGAATTCCTTAGGCTTGTTCGGCAACATAG	31	57,4
SH3-207 Bam fwd	CATGGATCCGAAGAATACATTGCCCTGTATCCG	33	59,9
SH3-207 Eco rev	ATGGAATTCCTTAATCTTTCCGTTTAACATAGTTGGATGG	39	58,8
SH3-226 Bam fwd	CATGGATCCGATATTGTTGTTGCCCTGTACC	31	57,7
SH3-226 Eco rev	ATGGAATTCCTTAGTTTCAGTTTGGCAACGTAGTTG	34	57,9
SH3-227 Bam fwd	CATGGATCCATCATTTGTCGTGGCCCTG	27	59,3
SH3-227 Eco rev	ATGGAATTCCTTAATCAACACGGGCAACATAGTTG	34	59,9
SH3-228 Bam fwd	CATGGATCCACCCTGTTTGTGTCCTG	27	58,2
SH3-228 Eco rev	ATGGAATTCCTTAATCAACTGGGCAACATAGTTG	34	59,3
SH3-235 Bam fwd	CATGGATCCTATCAGTATCGTGCCCTGTATG	31	59,4
SH3-235 Eco rev	ATGGAATTCCTTAACCAATGTATTTCGACGTAAGTACC	36	59,0
SH3-239 Bam fwd	CATGGATCCATGCCGGCCTACGTC	24	58,5
SH3-239 Eco rev	ATGGAATTCCTTAACCTTCTTCGGTAACATAGTTGG	35	58,0
YCfus fwd	AAGTCCGGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	29	65,4
YCfus rev	TCGAGATCTCTTGTACAGCTCGTCCATGCC	30	63,0
Yes Bss fwd	GAGAGAGCGCGCTGACCATCTTTGTGCGCCCTG	32	61,4
Yes Not rev	CTCGCGGCCGCATCTGCTGGTGCAACATAGTTG	33	60,2

## Oligonucleotide für Klonierungen:

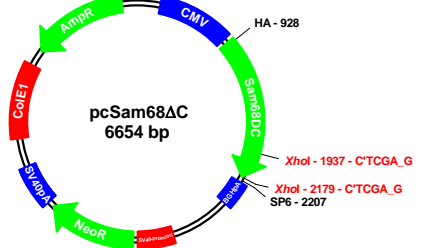
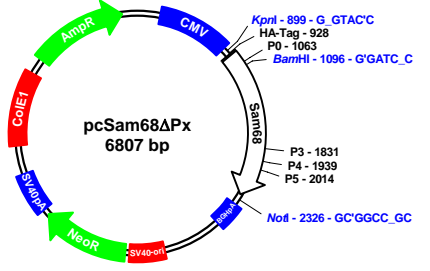
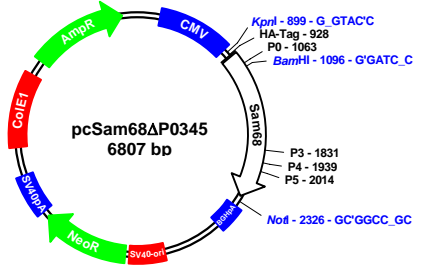
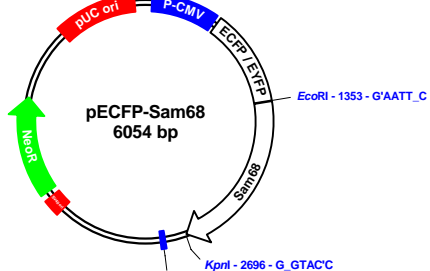
Name	Sequenz	Länge / bp
P0syn-fwd	GATCC CAGACGCCGTCTCGGCAGCCCGCTGCCTCACCCTCCCGGGAGGCGGAGGG T	60
P0syn-Mut1 fwd	GATCC CAGACGCCGTCTCGGCAGCCCGCTGCCTCACCCTCCCGGGAGGCGGAGGG T	60
P0syn-Mut1 rev	AATTA CCTCCGCCCTCCCGGGACCGGTGAGGCAGCGCGGCTGCCGAGACGGCGTCTG G	63
P0syn-Mut2 fwd	GATCC CAGACGCCGTCTCGGCAGCGCCGCTGCCTCACCCTCCCGGGAGGCGGAGGG T	63
P0syn-Mut2 rev	AATTA CCTCCGCCCTCCCGGGACCGGTGAGGCAGCGCGGCTGCCGAGACGGCGTCTG G	66
P0syn-Mut3 fwd	GATCC CAGACGCCGTCTCGGCAGCCCGCTGGCTCACCCTCCCGGGAGGCGGAGGG T	66
P0syn-Mut3 rev	AATTA CCTCCGCCCTCCCGGGACCGGTGAGGCAGCGCGGCTGCCGAGACGGCGTCTG G	63
P0syn-Mut4 fwd	GATCC CAGACGCCGTCTCGGCAGCGCCGCTGGCTCACCCTCCCGGGAGGCGGAGGG T	63
P0syn-Mut4 rev	AATTA CCTCCGCCCTCCCGGGACCGGTGAGGCAGCGCGGCTGCCGAGACGGCGTCTG G	63
P0syn-rev	AATTA CCTCCGCCCTCCCGGGACCGGTGAGGCAGCGCGGCTGCCGAGACGGCGTCTG G	63
P1syn-fwd	GATCC GCCTCGCCCGCCACGCAGCCGCCACCGCTGCTGCCGCCCTCGGCCACGGGTCCCGAC T	66
P1syn-rev	AATTA GTCGGGACCGTGGCCGAGGGCGGCAGCAGCGGCTGGCGGCTGGCTGGCGGCGAGGC G	66
P2syn-fwd	GATCC GCGACAGTGGGCGGGCAGCGCCGACCCGCTGCTGCCCCCTCGGCCACAGCCTCGGTC T	63
P2syn-rev	AATTA GACCGAGGCTGTGGCCGAGGGGGCAGCAGCGGGTGGCGCTGGCCGCCACTGTGCGC G	63
P3syn-fwd	GATCC AGAGGCCGGGAGCTGCACCTCTCCACCACCTGTTCCAGGGGCCGTGGTGTGGA T	60
P3syn-Mut1 fwd	GATCC AGAGGCCGGGAGCTGCAGCTCTCCAGCACCTGTTCCAGGGGCCGTGGTGTGGA T	60
P3syn-Mut1 rev	AATTA TCCAACACCACGGCCCTGGGAACAGTGTGGAGAGCTGCAGCTCCCGGCCTCT G	60
P3syn-Mut2 fwd	GATCC AGAGGCCGGGAGCTGCACCTGTCTCCACCAGCTGTTCCAGGGGCCGTGGTGTGGA T	60
P3syn-Mut2 rev	AATTA TCCAACACCACGGCCCTGGGAACAGTGTGGAGCAGTGCAGCTCCCGGCCTCT G	60
P3syn-Mut3 fwd	GATCC AGAGGCCGGGAGCTGCACCTCTCCAGCACCTGTTGCCAGGGGCCGTGGTGTGGA T	60
P3syn-Mut3 rev	AATTA TCCAACACCACGGCCCTGGGAACAGTGTGGAGGAGTGCAGCTCCCGGCCTCT G	60
P3syn-Mut4 fwd	GATCC AGAGGCCGGGAGCTGCAGCTGTCTCCAGCACCTGTTCCAGGGGCCGTGGTGTGGA T	60
P3syn-Mut4 rev	AATTA TCCAACACCACGGCCCTGGGAACAGTGTGGAGCAGTGCAGCTCCCGGCCTCT G	63
P3syn-Mut5 fwd	GATCC AGAGGCCGGGAGCTGCAGCTCTCCAGCACCTGTTGCCAGGGGCCGTGGTGTGGA T	63
P3syn-Mut5 rev	AATTA TCCAACACCACGGCCCTGGGAACAGTGTGGAGGAGTGCAGCTCCCGGCCTCT G	63
P3syn-Mut6 fwd	GATCC AGAGGCCGGGAGCTGCAGCTGTCTCCAGCACCTGTTGCCAGGGGCCGTGGTGTGGA T	63
P3syn-Mut6 rev	AATTA TCCAACACCACGGCCCTGGGAACAGTGTGGAGCAGTGCAGCTCCCGGCCTCT G	63
P3syn-Mut7 fwd	GATCC AGAGGCCGGGAGCTGCAGCTGTCTCCAGCACCTGTTGCCAGGGGCCGTGGTGTGGA T	63
P3syn-Mut7 rev	AATTA TCCAACACCACGGCCCTGGGAACAGTGTGGAGCAGTGCAGCTCCCGGCCTCT G	63
P3syn-rev	AATTA TCCAACACCACGGCCCTGGGAACAGTGTGGAGGAGTGCAGCTCCCGGCCTCT G	63
P4syn-fwd	GATCC AGAGGTGCCACTGTGACTCGAGGCGTGCCACCCCACTACTGTGAGGGGTGCCCA T	63
P4syn-Mut1 fwd	GATCC AGAGGTGCCACTGTGACTCGAGGCGTGCCACCCCACTACTGTGAGGGGTGCCCA T	63
P4syn-Mut1 rev	AATTA TGGGGCACCCCTCACAGTAGGTGGGGTGCCACGCCTGCAGTCACAGTGGCACCTCT G	63
P4syn-Mut2 fwd	GATCC AGAGGTGCCACTGTGACTCGAGGCGTGCCACCCCACTACTGTGAGGGGTGCCCA T	63
P4syn-Mut2 rev	AATTA TGGGGCACCCCTCACAGTAGGTGGGGTGCCACGCCTGCAGTCACAGTGGCACCTCT G	63
P4syn-Mut3 fwd	GATCC AGAGGTGCCACTGTGACTCGAGGCGTGCCACCCCACTACTGTGAGGGGTGCCCA T	63
P4syn-Mut3 rev	AATTA TGGGGCACCCCTCACAGTAGGTGGGGTGCCACGCCTGCAGTCACAGTGGCACCTCT G	63
P4syn-Mut4 fwd	GATCC AGAGGTGCCACTGTGACTCGAGGCGTGCCACCCCACTACTGTGAGGGGTGCCCA T	63
P4syn-Mut4 rev	AATTA TGGGGCACCCCTCACAGTAGGTGGGGTGCCACGCCTGCAGTCACAGTGGCACCTCT G	63
P4syn-rev	AATTA TGGGGCACCCCTCACAGTAGGTGGGGTGCCACGCCTGCAGTCACAGTGGCACCTCT G	63
P5syn-fwd	GATCC GCGGGCATCCAGAGGATACCTTTGCTCCACCTCCTGCACCAGAAACATATGAAGAATAT T	63
P5syn-Mut1 fwd	GATCC GCGGGCATCCAGAGGATAGCTTTGCTCGACCTCCTGCACCAGAAACATATGAAGAATAT T	63
P5syn-Mut1 rev	AATTA ATATTCTTCATATGTTTCTGGTGACAGAGGTGCAGGCAAAGCTATCCTCTGGATGCCCGC G	63
P5syn-Mut2 fwd	GATCC GCGGGCATCCAGAGGATACCTTTGCTCCACCTCCTGCAGCAGAAACATATGAAGAATAT T	63
P5syn-Mut2 rev	AATTA ATATTCTTCATATGTTTCTGGTGACAGAGGTGCAGGCAAAGGTATCCTCTGGATGCCCGC G	66
P5syn-Mut3 fwd	GATCC GCGGGCATCCAGAGGATACCTTTGCTCCACCTCCTGCACCAGAAACATATGAAGAATAT T	66
P5syn-Mut3 rev	AATTA ATATTCTTCATATGTTTCTGGTGACAGAGGTGCAGGCAAAGGTATCCTCTGGATGCCCGC G	66
P5syn-Mut4 fwd	GATCC GCGGGCATCCAGAGGATAGCTTTGGCTCCACCTCCTGCACCAGAAACATATGAAGAATAT T	66
P5syn-Mut4 rev	AATTA ATATTCTTCATATGTTTCTGGTGACAGAGGTGCAGGCAAAGGTATCCTCTGGATGCCCGC G	66
P5syn-Mut5 fwd	GATCC GCGGGCATCCAGAGGATACCTTTGGCTCCACCTCCTGCACCAGAAACATATGAAGAATAT T	66
P5syn-Mut5 rev	AATTA ATATTCTTCATATGTTTCTGGTGACAGAGGTGCAGGCAAAGGTATCCTCTGGATGCCCGC G	66
P5syn-rev	AATTA ATATTCTTCATATGTTTCTGGTGACAGAGGTGCAGGCAAAGGTATCCTCTGGATGCCCGC G	66
P6syn-fwd	GATCC GGGACCAGGCGCTCGCTGAAGGCCCTCCTGCTAGGCCAGTGAAGGGAGCATACAGA T	66
P6syn-rev	AATTA TCTGTATGCTCCCTTCACTGGCCTAGCAGAGGGGCCCTCAGCGACGGCTGGTCCC G	66
PKI-NES-1 fwd	CCGGC CTGGCCCTGAAGCTGGCCGGCTGGACATCTAA GGTAC	43
PKI-NES-2 fwd	AATTC CTGGCCCTGAAGCTGGCCGGCTGGACATCTAA GGTAC	43
PKI-NES-rev	CTTAGATGTCCAGGCCGGCCAGCTTCAGGGCCAGG	35

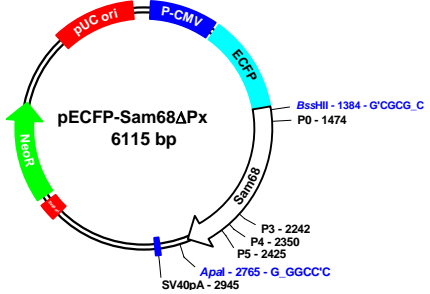
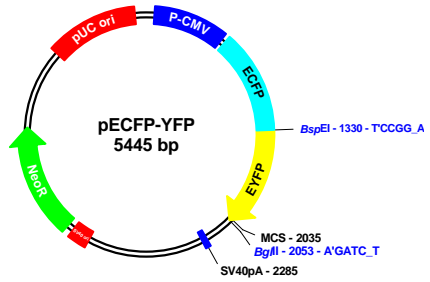
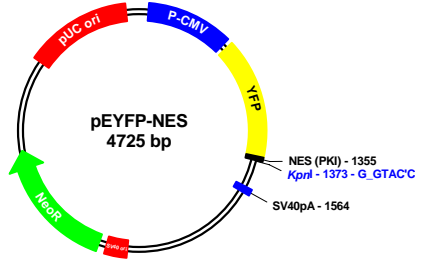
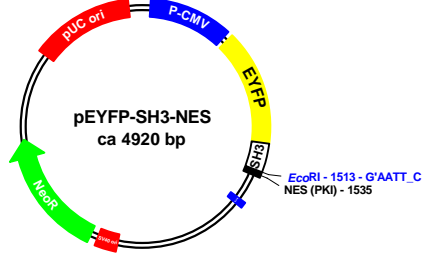
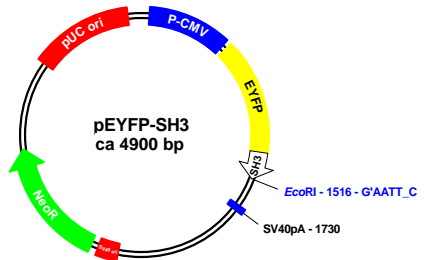
### 5.2.2 Ausgangskonstrukte

<p><b>Name:</b> pCANTAB-Yes und pCANTAB-Yes-opt</p> <p>Die Konstrukte wurden von Maria KELLNER im Rahmen ihrer Diplomarbeit hergestellt [173]. pCANTAB-Yes und -Yes-opt unterscheiden sich in 18 Nucleotiden im Bereich der SH3-Domäne.</p> <p>Phagmid zur Generierung von M13-Yes-SH3-Phagen. Die Yes-SH3-Domäne wird unter der Kontrolle eines lac-Promotors als Fusion mit dem Oberflächenprotein p3 exprimiert (monovalentes Display). Das p3-Signalpeptid steuert die Lokalisation des SH3-p3 zur Assemblierungs-Stelle.</p> <p>Das Phagmid besitzt neben dem ColE1-<i>origin</i> zur Replikation in Bakterien zusätzlich den von M13 abgeleiteten f1-<i>origin</i>, der die Verpackungssequenz enthält und von dem die Replikation des Phagmids als Phagenom ausgeht.</p>	 <p>pCANTAB-Yes 4681 bp</p> <p>p3 Signal - 445 PstI - 505 - C_TGCA'G XbaI - 595 NotI - 682 - GC'GGCC_GC</p>
<p><b>Name:</b> pcDNA3.1</p> <p>Kommerzieller Vektor von Invitrogen.</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor. Das in die MCS eingebrachte Gen wird unter der Kontrolle des starken viralen CMV-Promotors und einer BGH Polyadenylierungssequenz exprimiert. Als Selektionsmarker in Prokaryoten dient eine Ampicillin-Resistenz, in Eukaryoten eine Neomycin-Resistenz.</p>	 <p>pcDNA3.1+ 5428 bp</p> <p>AmpR CMV-P T7-Promotor - 870 MCS - 953 f1-ori NeoR pUC-ori</p>
<p><b>Name:</b> pCR-XL-TOPO</p> <p>Kommerzieller Vektor von Invitrogen.</p> <p>Erlaubt direkte Insertion von <i>blunt-end</i> DNA-Fragmenten an die offenen, Topoisomerase-aktivierten DNA-Enden (TOPO-Site).</p>	 <p>pCR-XL-TOPO 3519 bp</p> <p>MCS - 248 TOPO-Site - 336 lacZα ccdB KanR pUC ori AmpR</p>
<p><b>Name:</b> pcSam68-HA</p> <p>Das Konstrukt wurde von Axel MANN im Rahmen seiner Diplomarbeit hergestellt [195].</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor basierend auf pcDNA3 für Sam68 mit N-terminalem HA-Tag (YPYDVPDYA) unter Kontrolle eines CMV-Promotors.</p>	 <p>pc-Sam68-HA 6807 bp</p> <p>AmpR CMV KpnI - 899 - G_GTAC'C HA-Tag - 928 BamHI - 1096 - G'GATC_C Sam68 NotI - 2326 - GC'GGCC_GC SV40-ori NeoR ColE1</p>
<p><b>Name:</b> pECFP-C1</p> <p>Kommerzieller Vektor von Clontech/Takara.</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor für die Produktion von Fusionsproteinen mit N-terminalem cyan fluoreszierenden Protein (CFP) unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Der Vektor besitzt eine Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette als Selektionsmarker sowohl für prokaryotische als auch für eukaryotische Zellen. (ECFP = <i>enhanced</i> CFP)</p>	 <p>pECFP-C1 4731 bp</p> <p>P-CMV ECFP MCS - 1313 BglII - 1339 - A'GATC_T EcoRI - 1359 - G'AATT_C KpnI - 1379 - G_GTAC'C SV40pA - 1570 NeoR pUC ori</p>

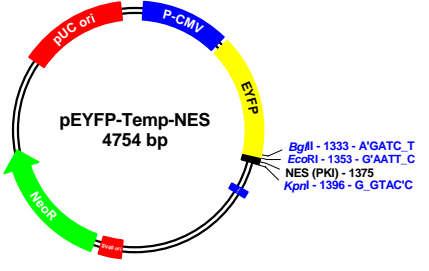
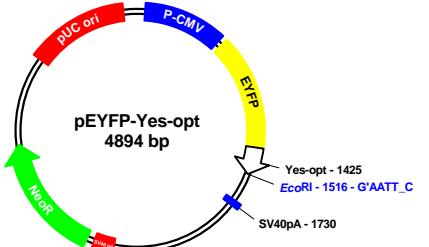
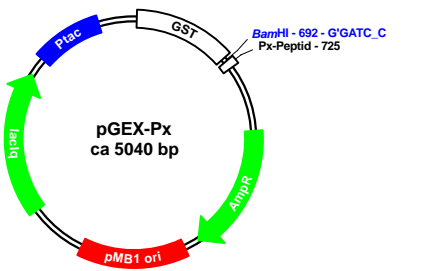
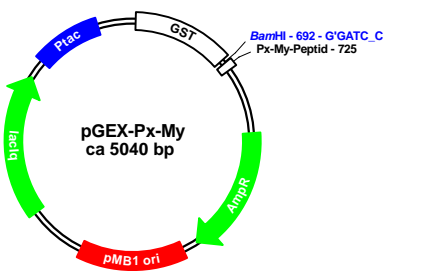
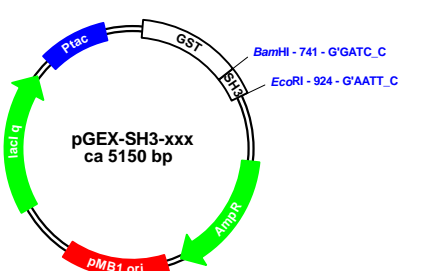
<p><b>Name:</b> pEYFP-C1</p> <p>Kommerzieller Vektor von Clontech/Takara.</p> <p>Entspricht pECFP-C1, aber das Plasmid trägt das Gen für das gelb fluoreszierende Protein (YFP). (EYFP = <i>enhanced YFP</i>)</p>	
<p><b>Name:</b> pGEX-KG</p> <p>Kommerzieller Vektor von GE Healthcare (ehemals Amersham).</p> <p>Erlaubt Expression mit N-terminalem GST-Tag unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren tac-Promotors. Der Vektor trägt neben einem Ampicillin-Resistenzgen den lacI<sup>q</sup>-Repressor, um die Proteinexpression im nicht-induzierten Zustand zu unterdrücken.</p>	
<p><b>Name:</b> pJH-SH3-xxx (291 Konstrukte)</p> <p>Die Vektoren wurden von der Geneart AG hergestellt. Phagmid zur Generierung von M13-SH3-Phagen. Die jeweilige SH3-Domäne wird unter der Kontrolle eines lac-Promotors als Fusion mit dem Hauptoberflächenprotein p8 exprimiert (polyvalentes Display). Das pelB-Sekretionssignal steuert die Lokalisation des SH3-p8 zum Periplasma, über das myc-Tag ist eine Detektion möglich. Das Phagmid besitzt neben dem ColE1-<i>origin</i> zur Replikation in Bakterien zusätzlich den von M13 abgeleiteten f1-<i>origin</i>, der die Verpackungssequenz enthält und von dem die Replikation des Phagmids als Phagenom ausgeht.</p>	
<p><b>Name:</b> pNL4-3</p> <p>Das Konstrukt enthält das vollständige B-clade HIV-Genom des Stamms NY5/BRU (LAV-1) in einem pUC-Vektor.</p> <p>Accession-Nr.: AF324493.1, Referenz: ADACHI <i>et al.</i>, 1986 [207]</p> <p>Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Regionen <i>gag</i>, <i>pol</i> und <i>env</i> markiert; die Gene der regulatorischen Proteine sind nicht gezeigt. D1 - D5 und A1 - A7 bezeichnet Spleiss-Donor und -Akzeptor-Stellen.</p>	
<p><b>Name:</b> pQE30</p> <p>Kommerzieller Vektor von Qiagen.</p> <p>Erlaubt Expression mit N-terminalem His-Tag (RGSHHHHHH) unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren lac-Promotors. Der Vektor trägt kein lacI<sup>q</sup>-Repressor-Gen, so dass er in entsprechenden Bakterien (M15[pREP4]), die den Repressor <i>in trans</i> produzieren, propagiert werden muss.</p>	

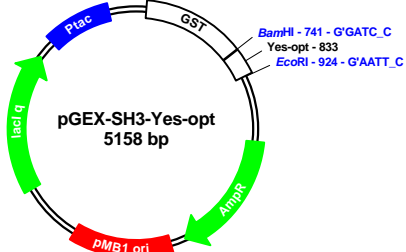
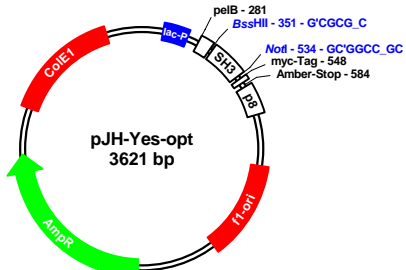
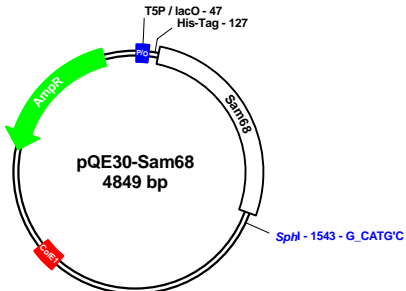
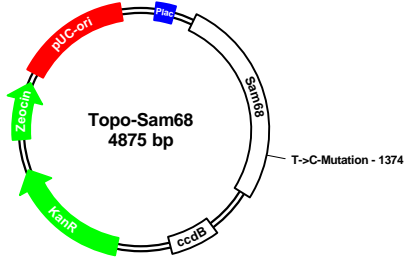
### 5.2.3 Klonierungen

<p><b>Name:</b> pcSam68ΔC</p> <p>Vektor: pcSam68-HA, XhoI-verdaut Insert: PCR-Produkt, XhoI-verdaut Template: pcSam68-HA Primer: »Sam68 488 fwd« und »Sam68Δ410 Xho rev«</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor für N-terminal HA-getagtes Sam68 mit Deletion des C-Terminus ab Aminosäure 410.</p>	
<p><b>Name:</b> pcSam68ΔPx (4 Konstrukte)</p> <p>Vektor: pcSam68-HA, KpnI / BamHI-verdaut für ΔP0 BamHI / NotI-verdaut für ΔP3, ΔP4, ΔP5 Insert: Fusions-PCR-Fragmente (1+2) KpnI / BamHI-verdaut für ΔP0 BamHI / NotI-verdaut für ΔP3, ΔP4, ΔP5 Template: jeweils pcSam68-HA Primer: ΔP0: 1 = »pc31 fwd« und »P0-KO-opt rev« 2 = »P0-KO-opt fwd« und »608 rev« ΔP3: 1 = »pc31 fwd« und »P3-KO-opt rev« 2 = »P3-KO-opt fwd« und »pc31 rev« ΔP4: 1 = »pc31 fwd« und »P4-KO-opt rev« 2 = »P4-KO-opt fwd« und »pc31 rev« ΔP5: 1 = »pc31 fwd« und »P5-KO-opt rev« 2 = »P5-KO-opt fwd« und »pc31 rev«</p> <p>Eukaryotische Expressionsvektoren für Sam68 mit mutierten Px-Motiven und N-terminalem HA-Tag.</p>	
<p><b>Name:</b> pcSam68ΔP0345</p> <p>Vektor: pcSam68ΔP0, BamHI / NotI-verdaut Insert: Fusions-PCR-Fragment (1+2), BamHI / NotI-verdaut Template 1: pcSam68ΔP3 Primer 1: »pc31 fwd« und »P4-KO-opt rev« Template 2: pcSam68ΔP5 Primer 2: »P4-KO-opt fwd« und »pc31 rev«</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor für Sam68 mit mutierten P0, P3, P4 und P5-Motiven und N-terminalem HA-Tag.</p>	
<p><b>Name:</b> pECFP-Sam68 bzw. pEYFP-Sam68 (2 Konstrukte)</p> <p>Vektor: pECFP-C1 bzw. pEYFP-C1, EcoRI / KpnI-verdaut Insert: PCR-Produkt, EcoRI / KpnI-verdaut Template: Topo-Sam68 Primer: »Sam68 Eco fwd« und »Sam68 Kpn rev«</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor für N-terminal CFP- oder YFP-getagtes Sam68.</p>	

<p><b>Name:</b> pECFP-Sam68ΔPx (5 Konstrukte)</p> <p>Vektor: pECFP-Sam68, Apal / BssHII-verdaut Insert: Apal / BssHII-Fragment aus pcSam68ΔPx</p> <p>Px steht für P0, P3, P4, P5 oder P0345</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor für N-terminal CFP-getagtes Sam68 mit Mutationen der Px-Motive</p>	
<p><b>Name:</b> pECFP-YFP</p> <p>Vektor: pECFP-C1, BspEI / BglII-verdaut Insert: PCR-Produkt, BspEI / BglII verdaut Template: pEYFP-C1 Primer: »YC fus fwd« und »YC fus rev«</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor für CFP-YFP-Fusionsprotein.</p>	
<p><b>Name:</b> pEYFP-NES</p> <p>Vektor: pEYFP-C1, BspEI / KpnI-verdaut Insert: Hybridisierte Oligonucleotide, PNK-behandelt »PKI-NES-1-fwd« und »PKI-NES-rev«</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor für YFP mit C-terminaler Kernexportsequenz des Protein-Kinase-Inhibitors (PKI), Sequenz: LALKLAGLDI</p>	
<p><b>Name:</b> pEYFP-SH3-NES (3 Konstrukte)</p> <p>Vektor: pEYFP-Temp-NES, BglII / EcoRI-verdaut Insert: PCR-Produkte, BamHI / EcoRI-verdaut Templates 1 und 2: pEYFP-SH3-029 und pEYFP-SH3-Yes-opt Primer 1 und 2: »SH3-029 Bam fwd« und »SH3-029 Eco oS rev« Template 3: pEYFP-SH3-188 Primer 3: »SH3-188 Bam fwd« und »SH3-188 Eco oS rev«</p> <p>Eukaryotische Expressionsvektoren für N-terminal YFP-getagte SH3-Domänen mit C-terminaler Kernexportsequenz des Protein-Kinase-Inhibitors (PKI), Sequenz: LALKLAGLDI</p>	
<p><b>Name:</b> pEYFP-SH3-xxx (10 Konstrukte)</p> <p>Vektor: pEYFP-C1, BglII / EcoRI-verdaut Insert: PCR-Produkte, BamHI / EcoRI verdaut Templates: pJH-SH3-xxx Primer: »SH3-xxx Bam fwd« und »SH3-xxx Eco rev«</p> <p>xxx steht für die Nummern der folgenden SH3-Domänen: 029 = Yes, 031 = Src, 188 = RasGAP, 206 = OSF, 207 = IS2#3, 226 = Lyn, 227 = Hck, 228 = Fyn, 235 = p85α, 239 = Nck1#2</p> <p>Eukaryotische Expressionsvektoren für N-terminal YFP-getagte SH3-Domänen.</p>	



<p><b>Name:</b> pEYFP-Temp-NES</p> <p>Vektor: pEYFP-C1, EcoRI / KpnI-verdaut Insert: Hybridisierte Oligonucleotide, PNK-behandelt »PKI-NES-2-fwd« und »PKI-NES-rev«</p> <p>Vektor zur Klonierung von YFP-SH3-NES-Konstrukten. YFP und NES sind nicht <i>in frame</i> - Einfügen einer SH3-Domäne über BglII / EcoRI stellt den Leserahmen wieder her.</p>	
<p><b>Name:</b> pEYFP-Yes-opt</p> <p>Vektor: pEYFP-C1, BglII / EcoRI-verdaut Insert: PCR-Produkt, BamHI / EcoRI verdaut Template: pCANTAB-Yes-opt Primer: »SH3-029 Bam fwd« und »SH3-029 Eco rev«</p> <p>Eukaryotischer Expressionsvektor für N-terminal YFP-getagte Yes-opt-SH3-Domäne.</p>	
<p><b>Name:</b> pGEX-Px (7 Konstrukte)</p> <p>Vektor: pGEX-KG, BamHI / EcoRI-verdaut Insert: Hybridisierte Oligonucleotide, PNK-behandelt »Pxsyn fwd« und »Pxsyn rev«</p> <p>x steht für die Nummer des jeweiligen Motivs, von 0 bis 6.</p> <p>Prokaryotische Expressionsvektoren für N-terminal GST-fusionierte PxxP-Peptide.</p>	
<p><b>Name:</b> pGEX-Px-My (20 Konstrukte)</p> <p>Vektor: pGEX-KG, BamHI / EcoRI-verdaut Insert: Hybridisierte Oligonucleotide, PNK-behandelt »Pxsyn-Muty fwd« und »Pxsyn-Muty rev«</p> <p>x steht für die Nummer des jeweiligen Motivs, y für die Mutante P0: M1 bis M4; P3: M1 bis M7; P4: M1 bis M4; P5: M1 bis M5</p> <p>Prokaryotische Expressionsvektoren für N-terminal GST-fusionierte PxxP-Peptide mit Mutationen.</p>	
<p><b>Name:</b> pGEX-SH3-xxx (10 Konstrukte)</p> <p>Vektor: pGEX-KG, BamHI / EcoRI-verdaut Insert: PCR-Produkte, BamHI / EcoRI-verdaut Templates: pJH-SH3-xxx Primer: »SH3-xxx Bam fwd« und »SH3-xxx Eco rev«</p> <p>xxx steht für die Nummern der folgenden SH3-Domänen: 029 = Yes, 031 = Src, 188 = RasGAP, 206 = OSF, 207 = IS2#3, 226 = Lyn, 227 = Hck, 228 = Fyn, 235 = p85α, 239 = Nck1#2</p> <p>Prokaryotische Expressionsvektoren für N-terminal GST-getagte SH3-Domänen.</p>	

<p><b>Name:</b> pGEX-SH3-Yes-opt</p> <p>Vektor: pGEX-KG, BamHI / EcoRI-verdaut  Insert: PCR-Produkte, BamHI / EcoRI-verdaut  Templates: pCANTAB-Yes-opt  Primer: »SH3-029 Bam fwd« und »SH3-029 Eco rev«</p> <p>Prokaryotische Expressionsvektoren für N-terminal GST-getagte Yes-opt-SH3-Domäne.</p>	 <p>pGEX-SH3-Yes-opt 5158 bp</p>
<p><b>Name:</b> pJH-Yes-opt</p> <p>Vektor: pJH-Yes, BssHII / NotI-verdaut  Insert: PCR-Produkt, BssHII / NotI verdaut  Template: pCANTAB-Yes-opt  Primer: »Yes Bss fwd« und »Yes Not rev«</p> <p>Phagmid zur Generierung von M13-Yes-opt-SH3-Phagen mit p8-SH3-Fusion.</p>	 <p>pJH-Yes-opt 3621 bp</p>
<p><b>Name:</b> pQE30-Sam68</p> <p>Vektor: pQE30, BamHI / SphI-verdaut  Insert: BclII / SphI-Fragment aus Topo-Sam68</p> <p>Prokaryotischer Expressionsvektor für N-terminal His-getagtes Sam68.</p>	 <p>pQE30-Sam68 4849 bp</p>
<p><b>Name:</b> Topo-Sam68</p> <p>Vektor: pCR-XL-TOPO  Insert: PCR-Produkt  Template: HEK293T-cDNA  mit Oligo-dT-Primer umgeschrieben  Primer: »Sam68 BclI fwd« und »Sam68 EcoRI rev«</p> <p>sam68 weist eine T→C-Mutation auf, welche die Aminosäure-Sequenz aber nicht beeinflusst.</p>	 <p>Topo-Sam68 4875 bp</p>

## 5.3 SH3-Phagen-Bibliothek

Nr.	Name	Aminosäure-Sequenz	Länge	Accession-Nr.
001	Jip-1	QTHRAIFRFVRHDELELEVDPLLVEQDAIYWEAYNMRTGARGVFAYIAIEVT	58	O43407
002	Ponsin #1	RPARAKFDFAQTILKELPLQKGDIVYITQIDQNWYEGHGRGVIFPRTYIELLP	56	O43857
003	PRAX-1 #1	QVFLARYSYNPFEKFNENPEARLPITAGEYIYIYGNMDEDFEGEELMDGRGLVFSNFVERVS	64	O75111
004	SLAP	DFLAVLSDFSPDISPFIIFRRGEKLRVISEDGGWKAISLSTGRESYIPGICVARVY	57	AAH07042
005	Ack	TDMLAQDFEERPKLHIQMDIVITVIEGRAENYWRGQNTTLCVGFPRNVVTSVA	57	Q07912
006	AbiBP3 / Abi-2	EKVVAIYDTKDKDELSFQEGAIIVYIKKNDGWYGVNNGVTGLSPGNYVESIM	56	Q13249
007	Tnk1	GPSEACVVDATFEGALRMETGDPITVIEGSSFSHSDSTIMKDNQRTFKVGSFPASAVTLTD	64	Q13470
008	DOCK180	KYGVAFNYDARGADELSQIGDVTWILLETYEGWYRGTILRKSKGIGIFASYIHLKE	58	Q14185
009	IRSp53	MRVKAIFSHAAGNSTLLSPKEGDLITLVIEGARDGWYGESEKTKMBGMFPFYTTRVLD	60	Q9BUM0
010	Mlk4	GLMAALYDYEARGEDELSLERQQLVEVLSQDAAYSDGEGWMAQVQVQRLGIFPANTYVAPCR	61	Q9H1Y7
011	Mlk1	PYTWAVFEYEAAGEDELTLRLGDVVEVLSKDSQVSGDEGWTOQLNQRVGIFPSPNYTPRS	61	Q9H2N5
012	Srm	QLFLALYDFTARCQGEELSVRRGDRCLALEEGGGYIFARRLSQQSPAGSLVPIITHAKAS	58	Q9H3Y6
013	SLAP-2	ATAVALGSFFAGGPARLSLRLGEPLTVISEGDWTVLSEVSGREYNIPFSHVAKVS	57	Q9H6Q3
014	CIN85 #3	DYCKVIFPPEAQNDDELTIKEGDIIVTLINKDCIDVWGEGELNGRGVFPDNFKLLP	58	Q9NYR0
015	CASKIN #1	LQVRATKYDCNNYDITSLNKGADIIITVLEQHPDGRWKGCIDHNRTGNDRGVFPSSLGEAIV	63	Q9P2P0
016	P-DLG	FYIRALYDRLADVEQLSEFKDDILYVDOTLPQOTFGSWAMQLDENAKIQRGQIPSKYVMDQE	65	Q9UE73
017	Homology to PRAX-1 #2	RVPVALSDYNPVMSANLKAAREELVFKQKRLRVWGSQDTHDFYLSKCHQVGNIPGLVAEME	65	Q9UF09
018	GRAF	RKAKALYACKAEHSDSEFTAGTVFDNVHPSQEPQWLEGTILNGKTGLIPENYVEFL	56	Q9UJ00
019	RelA associated inhibitor	GAVYALWDYSAEFGDELSPREGEVTVLERDGEPTDWWAALHQEGQVFPNYFLGFP	59	Q9Y290
020	STRIP/Shank1	RSPMAKSYQAQAEGLISLSKGEIKVLSIGEGGFWEGQVGRVGRWMPSDCLLEVA	56	Q9Y566
021	Mlk3	PVWTAIFYDEPSQDELALSKDREVEVLSDEDAISDGEWMAQVQVQGVGIFPSPNYVSRGG	61	AAH11263
022	FISH	TSMTCSAYKQVQDSISFAGVEVQVLEQKESGWYVVRGLEGWAPSHYLVLE	56	O43302
023	CCB4/CAB4	FAVKTNVSYCGALDEVPVSTAIISFDADKDFLHIKKYNNDMWIGRLVKEGCEIGFIPSLPLENI	66	O00305
024	P85B	FQYRALYFFRKEPEDLELLQGDVLVSRALQALVQAEGERCPQSGVMGMLNERTQRGDFPFYVEFLG	73	O00459
025	Fyb	HLAKACCDVQAGKNELSFQGEQIEIIRITDNPEKWLGRGTARGSYGKTAIVEIDY	58	O15117
026	Efs/Sin	QLARALYDNTAESEQLSFRRGDVLVRQEGAGGLDGCWLSLHQGGVIFANRKKLLP	60	O43281
027	Vinexin #3	TPYRAMYQYRPQNEDELEREGDVRVMMQCCDGGFVGSRRTKTGFQFPNGYVAPV	57	O60504
028	Abi	NLFVALYDFVASGNTLSITKGEKLRVLGNNHNGWECAQTQKQGWVPSNYITFVN	57	P00519
029	Yes	TIFVALYDYEARNTEDLSFKGERFQIINTTEGDMWEARSATGKNGYIFSNYVAPAD	58	P07947
030	Fgr	TLFIALYDYEARNTEDLITFKGEKFIINTTEGDMWEARSLSGKTCGIFSNYVAPVD	58	P09769
031	Src	TFVALYDYESRTEDLSFKGERLIQVNTTEGDMWLAHSLSTQGTGYIFSNYVAPSD	58	P12391
032	p67-phox #2	SQVEALFSYEATQPEDELFEQGDIIILVSKVNEEMLKECKKGVGIFPKVYVEDCA	56	P19878
033	Grb2 #1	MEAIKAYDFKATADDELSEFRKGDILKVLNEECQDMWYKARLNGKDFIPKNYIEMKP	57	P29354
034	Csk	TECIAKYNHGTAEQDLFPCKGDVLTIVATKPDNHWYKAKNYGRGLIPANTYVQKRE	58	P41240
035	Matk/Ctk	TQCIITKCEHTRPKPELAFRRGDVTVLEACEKSNYKVRHHTSQGGLAAGALREERE	59	P42679
036	Tec	EIVVAMYDQAAEGHDLRLERQGEVLIILEKNDVHWRARDYKNGEYIPSNYITGKK	57	P42680
037	Txk	IQVKALYDFLEPCNCLARAEVLIILEKYNPHWKAARDLNGEGLIPSNYITENK	57	P42681
038	Arg	NLFVALYDFVASGNTLSITKGEKLRVLGNNHNGWECAQTQKQGWVPSNYITFVN	57	P42684
039	Frk/Rak	HYFVALYDQARTAEDELSPRAGDKLVLDLHEGWFARHLKERRDSSQQLQGYIFSNYVAEDR	65	P42685
040	Crk #2	IYARVYDKRVNAYDKTALAEVGLVKKYKINVSQGWEGGCGNGRHGFFTHVRLLD	58	P46108
041	Blk	HFVVALYDYTMANDRLQMLKGEKLVKGTGDMWLARSVLTRGREGYVPSNFVARVE	57	P51451
042	CCB4/CAB1	FAVKTNVGYNPSQGDVEPVQGVAITFEKPDFLHIKKYNNDMWIGRLVKEGCEVGFIPSPVKLDS	65	O02641
043	Mlk2	PVWTAIFYEAAAGEDELTLARGDRVQVLSQPCAVSGDEGWTOQLPSGRGVFPSPNYVARGA	62	Q02779
044	ZO-1	FYIRTHFYEKESPYGLSFRKGEFRAVDTLVYNGLGSWLAIRIKGNHKEVERGIIIPNKRABQL	65	Q07157
045	Itk	TVVIALYDYQINDQPELALRRNEEYCLDSSEIHWWRVQDRNGHEGVFPSSYLVEKS	57	Q08881
046	Eps8	KYAKSKYDFVARNNSSELVLKDDILEILDRKQWVKRNASGDSGFVPMNILDIVR	66	Q12929
047	DLG1	LYVRALYDFDKTKDSGLSPQGLNFKFGDILVHGNASDEWMAQVTFPDGSEDEVGIPSKRKEVKK	57	Q12959
048	Jip-2	QTHRAVFRFIPRHDELDELVDVPLVEAEDEDFWFRGNMRTGERGVFPAYIAHAVP	58	q13387
049	Brk	KYVGLWDFKSRTEDELSFRAGDVFHVARKEQWMAWTLLEAGVAQGVYFBNYLAERE	61	Q13882
050	MPP2	VYVKCHFDYDPAFDSLIPCKEAGLEFNGAGLLIQVNDANWQACHVEGSGAGLIPSLLEEKR	65	Q14168
051	Eps8R2	KYVKILYDFTARNANELSVLKDLEVLDEDRGQWKLRSRSGQAGVYPCNILEGAR	56	BAB55354
052	Eps8R1	KWVLNVDYQARNNSSELVSKRDVLELDDSKWVKVRDPAQGEQVYVFNILTYTP	56	Q9GZQ2
053	Eps8R3	LKMVLYFEFARNPELITVQCKLEVLDSKRWLVNNEAGRSYIPSNILEPLQ	56	Q9H719
054	Homology to GEFs (KIAA1010) #6	QVTFVAVITFKARNPNELSVSANQKLIKLEPKDVTGNTEWLADEVNGKGVFPSPNYIRKTE	60	XP_050742
055	Nck2 #1	VIVIAKWDYTAQQQDELDIRKVNRLMLLDDSTKWRVNRANARTGYVPSNYVERKN	57	O43639
056	Homology to FBP17	GHCKAIYFDGHNEGTILAMEGEVLYIIEEDKGDGOWTARRQNGEEGVFTSYIDVTL	58	Q9BR51
057	TRIP-10	GHCVAIYHFEGSSEGTISMAEGDELSMEKDKGDGOWTARRQNGEEGVFTSYILRVTL	58	Q15642
058	FBP17	GTCKALYTFEGNQGTISVVEGTLYVIEEDKGDGOWTARRQNGEEGVFTSYIVECL	58	Q9NW01
059	Homology to p115 #1	CPAHVFRYQAGREDELITTEGEWLEVEIEGDADEWYKARNQHGVEGVFPERYLANFD	58	Q9NX8X
060	Homology to Intersectin	LTKCVVYSYKASQDELTIEHEVLEVEIEGDEMDWYKARNQHGVEGVFPERYLQFFT	58	AAH10394
061	Nephrocystin	EYIYAGDFTAQVQGDLTFFKGEILLVIEKKPDGWMIAKADKNGEGLVPRTYLEPYS	57	O14837
062	Trio	ELTVYIHDTACNSHMLTIRRGQTVFELERPHKFDVCLVTRTDRSPAERGLVPGSLCIAH	62	O75962
063	Trio #2	STMLVTHDYTAVKDEINIVYQGEVQVQLASNQNMFLVFRATDQCPAEGWIPGVLGHTSAVVENPD	70	O75962
064	Obscurin	DIYVVTADYLPAGFAQDAITLREQQVYVEVLDAHPLMWITKPTKSSPSRQWVSPAYLDRL	64	CAC44768
065	SPIN90/VIP54	MYRALYAFESAEPNALFAAGETFLVLSRSHRWLAARASGETGYVFPATLRLQ	57	Q9NZQ3
066	ARHGAP9	SQLCALYAFYTYGADQQVSLAEGDRFLLLKRLNSDWLAARLEAFSTSRIPFVPAAYMIEES	63	BAB56159
067	Grap #1	MESVALYSQATESDELAFNRGDTLKIINNEDEQWYKARLGEVGFIPKNYIRVPK	57	Q13588
068	GADS/Grp2 #1	MEAVAKFDFTASGEDELSPHTGDVLKILSNGEWFKAELSGQGVYFKNFDIQF	55	O75791
069	Myosin VII-a	KYVVALQCNPNPAGESGSLFAKGDILIDHDTQCEQWNSGWANGINERTQRGDFPTDCVYVMP	66	Q13402
070	SH3BP4	KEVIAIKDYCPTNTTTLKFSKGDHVLVLDTSQGEWYAHNTTEMGYIPSSYQQLN	56	Q9P0V3
071	SKAP55	NFYQLWDCTGAFSDLSFKRGDVIYILSKENYKGMWVGEMKGAIGLVFKAYIMENY	58	O43349
072	SKAP55	SYTQGLWDCHGQDPELSPQRGDLIRLSKEYNMYGMWVGLNSLIGLVIPKEYLTFAT	58	O15268
073	53BP2	GVIYALWDYEPQNDDELPMKEDCMTIIEDEDEDIENWVARLNDKGYVPRNLLGLYP	59	Q13625
074	ASPP1	GVAVALWDYEAQNSDELSPHGEDALTIIEKDESETEWMAKLDGREGYVFNLLGLYP	59	ca83011
075	Nck2 #3	HVVQTLYPFSSTEELANFKGETMEVIEKPENDPEWKKCNKARQVGLVFNKNTYVVL	59	O43639
076	NESCA	RAVRALCDHTAARPDQLSFRERGEVLRVITVDEWMLRCGRDMEGLVFPVGYLSVL	56	Q9BVN2
077	Homology to NESCA	CEVQALCHILATGPGQLSFHKGDLRLVLRAGAGDMLRCRSGPDSGLVPLAVYTLTP	56	O15080
078	Grp #2	CFAQAQDFDSAQDPSQLSFRGDIIEVLERPDHPWRMRGSCRGVGFPPSYVQPVH	56	Q13588
079	Homology to Lasp-1	KRYRAAYDYSAADEDAVSPQGDITVNVQIIDGMYGTVERTGDTGMLPANTYVEAI	57	AAH12460
080	Lasp-1/MLN 50	KRYRAAYDYSAADEDEVSPQGDITVNVQIIDGMYGTVERTGDTGMLPANTYVEAI	57	Q14847
081	Nebulin	KIFRAMYDYMADAEVSPKGDGAIINVAQIDEGMYGTVERTGDTGMLPANTYVEAI	57	Q15346
082	Peroxin-13	VVARAEYDFAVSEERISFRAGDMLNALKEQPKVPRKMLASLDGQTTGLIPANTYKILG	61	Q92968
083	PACSIN1	VVRVALYDYDGQDELSFKAGDELTKLEEDQECQCRGLDSQGLVLPANTYVEAI	57	Q9BY11
084	PACSIN2	VVRVALYDYDGQDELSFKAGDELTKMEDEDEQECQCRGLDSQGLVLPANTYVEAIQ	58	AAH08037
085	PACSIN3	VVRVALYDYAGQEADELSPRAGEELLSKSEDEQECQCGQLQSGRIGLYPANTYVECVG	58	AAH07914
086	HEFL	LLARALYDKPCDSELAFSRGDILITLQHVPESEGWKCLLHGRQGLAPANRLQILT	59	BAB55351
087	Homology to FISH	EETYYIAEFQTTIPDGISFQAGLKEVIERKNSGWWYIQLIEKEGWAPATPILDKYK	56	Q9P2Q1
088	FISH #3	VEYTYIAEFQSCISDGSIFRFGQKAEVIDRNSGGWYVQIEKEGWAPASYIDKKK	56	O43302
089	FISH #2	EKYTVQPYTSQSKDEIGFEKGVTVIRKINLNGWYIYRLGKEGWAPASYLKKAK	56	O43302
090	FISH #1	EQYVVSYNKKQENSELQAGVEVDVIEKNEGSMFVSTSEQGWVPATYLEAQN	56	Q9H462
091	p47-phox #1	QTYRAIADYEKTSSESMALSTGDVVEVVEKSESGWVFCQMKAKRWIPASFLFELD	56	P14598
092	Homology to p47-phox	QSLRCLQFPCTQDTRHDFPQAQASLVDLLRHPSGWLVENEDQTAWMPAPYLEEAA	59	aah15917
093	FISH #5	DVYVSIADYEGDETAGFGEGSVMEVLRNPNMWYCYILDGVKPKFGWVSNYLEKKN	59	O43302
094	Homology to FISH	SLYVAVADFEKDKTDSFQBQTVFVEKEKNSGWNFCQVLSGAPSEGWGIPSNLYKKK	59	Q9P2Q1
095	p47-phox #2	EPTVIAKAYTAEVGEVSSLEGEAVEVHLLDGMWVIRKDDVTGYPPSMYKQSG	56	P14598
096	SH3GLB1/endophilin B1	RKARVLVDYDAANSTELSLADEVITVFSVQWDSMDMGERGNQKGVPIITYLELN	58	AAH07455
097	SH3GLB2/endophilin B2	RKARVLVDYDAANSTELSLADEVITVFSVQWDSMDMGERGNQKGVPIITYLELN	58	BAB47477
098	CD2BP1	QETRALYDYTAQNPELDLSAGDILEVILGEGDWGVTVERNGRGVFGVSYLEKL	55	AAH08602
099	Abi-1	EKVVAIYDTKDKDELSFMEGAIIVYIKKNDGWYGVNNGVTGLSPGNYVESIM	56	Q9NXZ9
100	NESH	EKVVTLYPSTQKDNELSSSEGTIVCYTRYISDGCCEGVSSGEGTGFPGNYVEPC	56	AAH07780
101	Homology to Intersectin 1	CFVKALYDYEGQTDDELSPFEGAIIRILNKENQDQDGFWEFEGFNRIGVFPSSVLEELS	59	O94868
102	Homology to p115 #2	FLAQUALYSTGSAEELSPFEGALIRLLPRAQDGVDFGWRGEFGGRGVFPSSVLEELL	60	Q9NX8X



Nr.	Name	Aminosäure-Sequenz	Länge	Accession-Nr.
209	Homology to Stac	HYFVALYRKALKEDDLDFPFGEKITVDDSDNEEWNRKIGEKVGFPFNNFIIIRV	56	AAH08069
210	Stac	NTYVALYKFPQENEDLEMRPGDITLLEDSDNEDWKGKIQDRIGFFPANFVQLQ	56	Q99469
211	DOCK2	RHGVAIYNFGSGGAPQLSLQIGDVRIGTQCGDWRGVLKHKMLQGIFFKFSIHKE	58	Q92608
212	SH3d19 #2	PHAVLHDFPARQVDDNLNLTSGEIVYLLEKIDTDWYKNCNRIQIFPANYVKVII	56	Q9UFC8
213	POSH #1	PCAKALYNYEGKEPGLDKFSKGDIIILRKVDENYHGVENGHIGFFPTNFVQIIK	56	Q9HAM2
214	SH3d19 #3	SRCAVFEYIGEKGDELKFSSEGEIIILKEYNENKARKEVGRGTGIFPLNFVEPVE	56	Q9UFC8
215	Antigen NY-CO-31	YQVVAQHSYSAQGPEDLGFQGDITVDVLCEDVQAMLEGHCDRIGIFPKCFVVPAG	57	O60533
216	SH3d19 #4	EWCEALHSPTARTSDSLSPKRGDRIQILERLSDWCKRGLQDREGIPPAVTVRCP	56	Q9UFC8
217	Homology to Myosin XV	GYVIALRSYITDNCSSLSPHKGDLIKLPVATLEPQWQFSGAGSGSLFPADIVQPA	58	BAB47412
218	Myosin XV	DYVAVRNFLPEDALLAFHKGDIIHLQLEPPFVGYSGACVVRKXVYVLEELRRRGDFGWRFGTINGRVGRFPSELVQ	80	Q9UKN7
219	N-Src	TYFVALYDYSKRTETDLSPKGERLQIVNTRKVDVREGDNLHSLSTGQGYIPSNYVAFSD	64	VTHUSC
220	Vav3 #1	PMQAVIRNYSGTGPPALHEGPPQLQAGDITVELLKGDAHSLFQWGRNLASGEYGFSSDAVKPCP	65	Q9UKW4
221	Vav2 #1	PMQAVIRNYSGTGPPALHEGPPQLQAGDITVELLKGDESPWMEGRGLVQTRKSGYFSSSVKPCP	63	P52735
222	Homology to Abl-philin 2	VRKYVEDYSGACPCNLKNGIKTFFTSCTEERIQLEKGEFIALTRGLRYWLYGDKILDDSPIEGVSRIIRGWFPRKCEVKCP	82	AAH07213
223	Nck1 #1	VVVAVFDYVAQGEQELDIKKNERLMLDDSKSWVRVRSNMKTGFVPSNTYVERKN	56	P16333
224	DUET/TRAD	SSMAIKDYIYALKENEICVSGEVVQVLAVNQNNCLVYQASDHSFAEAGWVPGSILAPLT	62	Q9NS24
225	Lck	NLVIALHSYEPDHDGLGFKGEQLRLILEGSGENWKAQSLTTGQEGFIPFNVAKAN	57	P06239
226	Lyn	DIVVALYDPDGIHPDGLSFKGEKMKVLEKSGENWKAQSLTTGQEGFIPSNYVAKLN	57	P07948
227	Hck	IIVVALYDYEAHHDGLSFKGQDMVVLKSGENWKAQSLTTGQEGFIPSNYVAVRD	57	P08631
228	Fyn	TLFVALYDYEARTEDDLSFKGEKFPQILNSESQENWKAQSLTTGQGYIPSNYVAVRD	58	P06241
229	Crk #1	EYVVALDFDNGDEEDLFPKKGDLILRIRKPEEQWNAEDSEKRGMPVFPVVEKTR	57	P46108
230	CrkL #1	EYVRTLDFDNGDAEDLFPKKGELIIVIEKPEEQWNAEDSEKRGMPVFPVVEKLV	57	P46109
231	Nck1 #3	HVVQALYFSSNDEELNFKGDVMDVIEKPEENWKAQSLTTGQEGFIPFNVAKAN	59	P16333
232	Nebulette	RTYRAMYDYSAGQDEVSFREDGYIVNVQPIDDGMVYGTQVTRGTMFLPANYIEFVN	58	O76041
233	p130Cas	VLAVALYDNVAESPELDFSKGDMITVLEQDTGLDGMWLSLHGRQIGVPGNRLKILV	59	P56945
234	HEF1/CasL	LMARALYDNVPECAELAFKRGDILTVIEQNTGLGEMWLSLHGRQIGVPGNRLKILV	59	Q14511
235	P85A	YQYRALYDYKEREEDLHGLDILTVNKGSLVALGSDQKARPEIHWLNGYNETTGERGDFPGTYVEYIG	73	P27986
236	SRGAP1	IEALAKFDYVGRSARELSLKEGDIILKLNKQGWQWGEIYGRVGNFPMYVEEDY	56	Q9H843
237	SRGAP3	IEALAKFDYMGSRPELSLKEGDIILKLNKQGWQWGEIYGRVGNFPMYVEEDY	56	O43295
238	Vav1 #2	MPAYVYFMYMAEDELSLIKGTVIMWCKSDGWRSYNGQWVFPFNTYVEEG	57	P15498
239	Nck1 #2	MPAYVYFMYMAEDELSLIKGTVIMWCKSDGWRSYNGQWVFPFNTYVEEG	56	P16333
240	Alpha-PIX / Cool2 / ARHGEF6	LIVARFNFQQTNEDELSVCKGDIIYVTRVEEGSWEGTILNGRTGWFPNTYVERIK	56	Q15052
241	Beta-PIX / Cool1 / ARHGEF7	LIVARFNFQQTNEDELSVCKGDIIYVTRVEEGSWEGTILNGRTGWFPNTYVERIK	56	Q14155
242	GADS/Grp2 #2	RWARALYDFALEDDELGFHSGEVVEVLDSSNPMWTRGLNKLGLFPAFYVAPMT	56	O75791
243	Grb2 #2	TYVQALYDFDQDEGLGFRGDFLHVMDNSDPNNWKAQSLTTGQEGFIPFNVAKAN	56	P29354
244	ArgBP2a #3	EPFQALYNYTPRNEDELESDVDIMWCKSDGWVFGTISRRKTGFTGTPGNYVKRL	57	O60592
245	Vav1 #1	PMXVFQYEGYGLPPFGAIGPFLRLNPGDILVIEKPEEQWNAEDSEKRGMPVFPVVEKTR	65	P15498
246	Blk	KKVVALYDYMNPANDLQLEKGEDEYFIEESNLPMWRARKNQGEQIPSNYVTEAE	57	Q06187
247	Homology to GEFs (KIAA1010) #4	TYGVALYRQALEPNELDFEVGDKIRIATLEQDGLASENWTLGQDRTGKTLVPMACLYTIP	56	XP_050742
248	SH3d19 #1	PHGIANEDIVSQNGPELCKRKGDLVLMKQTEENYLEKQEGDRTGTVHLSQMKIIT	56	Q9UFC8
249	Homology to GEFs (KIAA1010) #1	SVYRAIFDFCPVSSEELPLFPGDIIIVLADEPFLWKLKEDVTGQPPSSPVEIVT	56	XP_050742
250	Homology to GEFs (KIAA1010) #2	RLPVCICEFTSQELDNLPLARGDLVLDGIPTAGWLQGRSCWARGFFSSCVREL	57	XP_050742
251	Homology to GEFs (KIAA1010) #3	QGARALMLSAQLEDELDFREGDVIITIGVEPGWFEGLGRRGIFPEGFVELLG	56	XP_050742
252	Neuronal GEF	PQVQCVHPYVAQDELTLELADILNIDKTDGMIIPGERLHGRWGFSSMTTEIL	58	AAH31573
253	Predicted protein for MGC:32065	LKGRALYDFHSEKKEEIIQQDEDLVIFSETSLDGMQGGNSRGTLGFPASYVEIVR	58	AAH18775
254	PRAM-1	REFRKKFKFEGEIVHVTMMDIPNKTNRGDSGKHGILRRGELEIVIEFTSNEMLCRDPKKGYYVTRTALLPLE	75	AAH28012
255	PP905	VYVLEHPEFTYKDGRRVAILPNERVYLLRSTENHWHVRKFGGPFYLAQYVERLP	60	AAG23796
256	Predicted protein FLJ00204 #1	NVYLALYAYFPQKSELELHKGEMVRLKQCGDGFKASGLRGTGVSGFPGNYTPVS	58	BAB84957
257	Predicted protein FLJ00204 #2	ERYVYVVSYPQSEARIELEKGDIVFVHKRKGDMYKTLQNRGRTGLFGFSVFESF	57	BAB84957
258	Homology to myosin VIIb / FLJ00256	IFAMALQDRKATDITTLAPFKGDLVLTQKGLLASENWTLGQDRTGKTLVPMACLYTIP	63	BAB85009
259	Predicted zinc finger protein FLJ23654 #1	PRAKALCNYRGNQNGDELFRMGDIIILREKLDENYQGEISQISGNPSSVSEVIK	56	BAB85025
260	Predicted zinc finger protein FLJ23654 #2	PLCRALYNFDLRGDKSENQDCLFLAKDDIITVIRSDVENMARGKLDKVGIFLPAVEENL	62	BAB85025
261	Predicted zinc finger protein FLJ23654 #3	NMFVALRSYSANGPDELQKGEVGRVLRGKQDGLRGVSLTVGRGVIFPNTYVIF	58	BAB85025
262	ARHGAP12a	VYIEVEYDEYEAARKIRIVIKGERYILVAKTINDDQWQVPEPDSKAFYPAQYKEVT	59	AAK52311
263	Kalirin / Duo	ELTVVLQDFSGHSSSELTIGVQGTVELLERPSERPGWGLVTRTERSPLEGLVPSALL	58	AAH15265
264	Predicted GEF-containing protein	PQVQCVRTYKALHDPDELTEKTDILSVRTWTSQDGLGVLADGKGMWQVPAVEEIS	58	AAH40640
265	MOCA / PBP	KYGVVICSFRGSPVQGLVLEIGETVQILEKCEGWRGVSSTKPNVKGIFPANYIHLKX	58	AAH12301
266	p41NOX #2	PQFCASRAYESSRADELSPAGARVRLSETDRGWLCRYDGRAGLPAVLRLPEG	56	AAH75141
267	Homology to p41NOX	YQVVAQHSYSAQGPEDLGFQGDITVDVLCEDVQAMLEGHCDRIGIFPKCFVVPAG	63	AAH41594
268	AblBP3 / Abi-2	EKVVAIYDYTKDEDELDFQEGALIIYIKKNDGMYGVNMGVTGLFGPNYVESIM	57	Q13249
269	Nck2 #1	VIVIAKNWYTAQDQDELIDIKKNERLMLDDSKSWVRVRSNMKTGFVPSNTYVERKN	56	O43639
270	Graf2	RKARAVYPCAEHSSSELFEIGAIFEDVQTSREPWLEGLTNKMKGLIPQNYVKLL	57	BAB61771
271	Predicted protein w. a RhoGEFdomain #1	ELYQAKRKCHATQYDINLLEDGLVAVIEQKPLGSTSRNLDTGNKGYVYSSFLKPYN	61	XM068278
272	Predicted protein of a human BAC	NYGVTLKAVLRQSKIDIFLEYFKGDTIALLGEGKVAIGQSKVKVYGVYLRGKIGLWCKMKVKVIS	67	AC005083
273	Predicted protein w. a RhoGEFdomain #2	QIFYAVHAFQARSDHLSQEQYQVHILRFPDCLSGNKEWLAQAQGGKGYFANYLGRMT	60	XM068278
274	Shank3	RKFIAVKAHSPQGEIEPLHGEAVKVLISIEGEGFWEGTVKGRGTGFPADCVVEEQ	56	BC045765
275	Predicted STAC-related protein	YSYVALYKFLPQENDLALQPGDRIMLVDDSDNEDWKGKIGDRVGFPPANFVQVR	56	ENSP00000269589
276	Tnk1-long splice variant	GPSEACVRDVTGALRMETGDTITVIEGSSSFHSDSTIMKGQNGRTKTVGSGFASAVTLAD	64	
277	Putative RhoGAP + SH3 protein	GAHVIRKRYTARAPDELTEVGDIVSVIMDPFKVLSTWWRGKHGQVGLFGHCVELINQVQSVYNS	69	ENSP00000257351
278	BPAG1	IPIKACDYRQIEITIKYKDECVLANNSHRAKMKVISTPTGNAIMPVSVCFTVPP	54	Q8WXX8
279	DUET	SSMAIKDYIYALKENEICVSGEVVQVLAVNQNNCLVYQASDHSFAEAGWVPGSILAPLTATAAESD	71	Q9NS24
280	Duo	ELTVVLQDFSGHSSSELTIGVQGTVELLERPSERPGWGLVTRTERSPLEGLVPSALLCISH	63	AAH15265
281	CCB3	FAVKNVSYGCVLDEECVQSGQWFEAKDFLHIEKYSNDWMLGRVKEGGDIATFSPQRLS	67	P54284
282	Myosin XV	DYVAVRNFLPEDALLAFHKGDIIHLQLEPPFVGYSGACVVRKXVYVLEELRRRGDFGWRFGTINGRVGRFPSELVQPA	84	Q9UKN7
283	RhoGAP	GAHVIRKRYTARAPDELTEVGDIVSVIMDPFKVLSTWWRGKHGQVGLFGHCVELIN	59	ENSP00000257351
284	Sorting nexin 26	AAHVIRKRYTAQAPDELSEFVDIVSVIMDPFEDRSWWRGKHGQVGFPPSECVLEFT	59	NP443180
285	SH3-ENSP00000315159/179-234	RLFAVAVKYPQVQDGEIPLHGDVRLVLSIEGEGFWEGSARGHIGWPAECVVEEQ	56	
286	SH3-ENSP00000325461/173-22	RQAKAMYSCAKHSHLESFPQGAIFSNVYPSVEPGWMLKATYEGTKGLVPSNVVFL	56	
287	Dbs	KGYTVADHEKGGDVALRVSGDVELVQEGDGLMYRVDPTTGKLGWVPASSLVRL	58	NM024979
288	SH3-ENSP00000305779/242-301	GRCKALTGYEPGEKDELNFYQGESIEIIGFVPLQWFIKSTSSQGVGFVTRNIDPDS	60	
289	DOCK4 (9-66)	KYGVVIAFRGTVPYGLSLEIGDITVQILEKCEGWRGVSSTKPNVKGIFPANYIHLKX	58	AAO73565
290	Non-erythroid alpha (a-II) spectrin	ELVLALYDYQESPREVTMKGDILTLLNSTNKARHREWLCDWVKVENDRGQGFVPAAYVKLLD	64	Q13813
291	Jip-2	QTHRAVFDLSPNRFRIFPHDDELDVDDPVLVLAEDDFWRFGRFMETGERGVFAFYAHAVP	65	q13387

## 5.4 Das Programm »SH3Seq«

Zur vereinfachten Auswertung der Phagmid-Sequenzierungen von Kandidaten aus dem Phagen-Display wurde ein Computerprogramm erstellt, das die von der Sequenzierfirma erhaltenen Sequenzen automatisch anhand der obigen Liste aller SH3-Domänen-Sequenzen auswertet. Das »SH3Seq« genannte Programm wurde in der Programmiersprache Object Pascal in einer Turbo-Delphi-Entwicklungs-Umgebung (Version 10.0) geschrieben.

Nach dem Start des Programms erscheint das folgende Fenster:



Nach dem Wechsel ins gewünschte Verzeichnis wählt man dort die auszuwertenden Sequenz-Dateien an und klickt auf den Button »Werte Sequenzen aus«, woraufhin im Feld rechts oben eine Liste mit der Zuordnung der jeweiligen Dateien zu den SH3-Domänen ausgegeben wird. Ein Klick auf die Spaltenüberschrift führt eine Sortierung der Elemente aus. Der Prozentwert in der »Score«-Spalte gibt an, wie gross die längste Übereinstimmung der übersetzten Aminosäure-Sequenz mit der in der Spalte »SH3-#« wiedergegebenen SH3-Domäne ist (s.u.). Falls die Zuordnung nicht eindeutig ist, wird als SH3-Domäne »n.d.« und als Score »0 %« sowie im darunter liegenden Feld eine Fehlermeldung ausgegeben. Dann ist eine manuelle Auswertung anhand des Sequenzierungs-Chromatogramms notwendig.

Die Auswertung wird dadurch erschwert, dass relativ häufig Fehler bei der Übersetzung der Sequenzier-Chromatogramm-Daten in die reine Sequenz auftreten, die oft zu Frameshifts führen. Die Ursache liegt in den meist noch im Reaktionsansatz enthaltenen Farbstoff-Terminator-Nucleotiden, die zu einem starken Signal in der Region um etwa 80 bp führen

können – beim verwendeten Sequenzier-Primer ist das mitten im Bereich der SH3-Domäne –, das oft fehlinterpretiert wird und manuell korrigiert werden müsste. Daher verwendet das Programm folgenden Algorithmus zur Auswertung der Sequenzen:

Nach Einlesen einer Datei im Textformat (z. B. Fasta-Format) wird zunächst der Sequenz-Bereich der SH3-Domäne, der zwischen den Schnittstellen BssHII (GCGCGC) und NotI (GCGGCCGC) liegt, isoliert und in allen drei Leserahmen in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Anschliessend wird die längste Übereinstimmung mit einer SH3-Domänen-Sequenz gesucht (abgelegt in der Datei »SH3.lst«). Diese muss für jede Kandidatensequenz eine gewisse Mindestlänge aufweisen, um sie eindeutig von allen anderen zu unterscheiden. Die notwendigen Längen wurden zuvor mit einem separaten Programm durch Vergleich jeder einzelnen mit allen anderen Sequenzen ermittelt und die Werte, die zwischen 4 % und 100 % liegen, sind ebenfalls in der »SH3.lst« hinterlegt. Wird diese Mindestlänge erreicht, kann die Zuordnung als sicher gelten, auch wenn keine perfekte Übereinstimmung der Sequenzen vorliegt.

Der Quell-Code des Kernalgorithmus, der den eigentlichen Vergleich durchführt, ist im folgenden wiedergegeben (Kommentare in grün):

```
// Variablendeklaration:
VAR ia,ib,ic,id,ie : integer; // Hilfsvariablen und Laufvariablen für Schleifen
    sa : string; // Hilfsvariable
    db_size : integer; // Grösse der Datenbank
    Frame : array[1..3] of string; // Feld für die drei übersetzten Leserahmen
    SH3DB : array[1..500,1..2] of string; // SH3-Sequenz-Datenbank, [x,1] = Name, [x,2] = Sequenz
    SH3DB_Score : array[1..500] of integer; // SH3-Sequenz-Datenbank, Score
    FoundLength : integer; // Ergebnis: Längste Übereinstimmung
    FoundName : string; // Ergebnis: Name der Sequenz mit längster Übereinstimmung

// Initialisierung der Variablen; Standard-Ergebnis falls keine Übereinstimmung gefunden wird:
FoundLength:=0;
FoundName:='Keine Übereinstimmung';

// Durchführung des Vergleichs:
for ie:=1 to 3 do // Vergleich für alle 3 Frames der übersetzten Sequenz durchführen
    BEGIN
        for ia:=1 to db_size do // Vergleich mit allen SH3-Sequenzen in der Datenbank (Variable db_size = 291)
            BEGIN
                // Berücksichtigung der Mindestlänge, die eine SH3-Sequenz von allen anderen unterscheidet:
                if SH3DB_Score[ia] < length(Frame[ie]) then
                    for ib:=1 to length(Frame[ie])-SH3DB_Score[ia] do // Analyse jeder möglichen Teilsequenz
                        BEGIN
                            ic:=0;
                            repeat
                                inc(ic);
                                sa:=copy(Frame[ie],ib,SH3DB_Score[ia]-1+ic); // Bildung der Teilsequenz
                                id:=0;
                                id:=POS(sa,SH3DB[ia,2]); // Suche der Teilsequenz in der SH3-Datenbank
                                if id > 0 then
                                    if FoundLength < Length(sa) then // Bisher längste Übereinstimmung
                                        BEGIN
                                            FoundLength:=Length(sa); // Ergebnis festhalten: Länge
                                            FoundName:=SH3DB[ia,1]; // Ergebnis festhalten: Name der Sequenz
                                        END;
                                    until (ib+ic=length(Frame[ie])) OR (id=0);
                                END; // Schleife ib: alle Teilsequenzen
                            END; // Schleife ia: alle 291 SH3-Domänen
                        END; // Schleife ie: 3x für jedes Frame
```

## Literaturverzeichnis

- [1] ROUS P. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1911 Apr; 13(4):397-411.
- [2] TEMIN HM, RUBIN H. Characteristics of an assay for Rous sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. *Virology*. 1958 Dez; 6(3):669-688.
- [3] MARTIN GS. The road to Src. *Oncogene*. 2004; 23(48):7910-7917.
- [4] STEHELIN D, VARMUS HE, BISHOP JM, VOGT PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*. 1976 März 11; 260(5547):170-173.
- [5] CZERNILOFSKY AP, LEVINSON AD, VARMUS HE, BISHOP JM, TISCHER E, GOODMAN HM. Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product. *Nature*. 1980 Sep 18; 287(5779):198-203.
- [6] THOMAS SM, BRUGGE JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997; 13513-609.
- [7] BOGGO TJ, ECK MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*. 2004 Okt 18; 23(48):7918-7927.
- [8] XU W, DOSHI A, LEI M, ECK MJ, HARRISON SC. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell*. 1999 Mai; 3(5):629-638.
- [9] HARRISON SC. Variation on an Src-like theme. *Cell*. 2003 März 21; 112(6):737-740.
- [10] BROMANN PA, KORKAYA H, COURTNEIDGE SA. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene*. 2004 Okt 18; 23(48):7957-7968.
- [11] COOPER JA, GOULD KL, CARTWRIGHT CA, HUNTER T. Tyr527 is phosphorylated in pp60c-src: implications for regulation. *Science*. 1986 März 21; 231(4744):1431-1434.
- [12] PARSONS SJ, PARSONS JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*. 2004 Okt 18; 23(48):7906-7909.
- [13] PALACIOS EH, WEISS A. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*. 2004 Okt 18; 23(48):7990-8000.
- [14] LOWELL CA, SORIANO P. Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes Dev*. 1996 Aug 1; 10(15):1845-1857.
- [15] PAWSON T. Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases: regulatory elements in signal transduction. *Oncogene*. 1988 Nov; 3(5):491-495.
- [16] MAYER BJ. SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell. Sci.* 2001 Apr; 114(Pt 7):1253-1263.
- [17] LEE CH, LEUNG B, LEMMON MA, ZHENG J, COWBURN D, KURIYAN J, SAKSELA K. A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J*. 1995 Okt 16; 14(20):5006-5015.
- [18] KÄRKÄINEN S, HIIPAKKA M, WANG J, KLEINO I, VÄHÄ-JAAKKOLA M, RENKEMA GH, LISS M, WAGNER R, SAKSELA K. Identification of preferred protein interactions by phage-display of the human Src homology-3 proteome. *EMBO Rep*. 2006 Feb; 7(2):186-191.
- [19] RUBIN GM, YANDELL MD, WORTMAN JR, GABOR MIKLOS GL, NELSON CR, HARIHARAN IK, FORTINI ME, LI PW, APWEILER R, FLEISCHMANN W, CHERRY JM, HENIKOFF S, SKUPSKI MP, MISRA S, ASHBURNER M, BIRNEY E, BOGUSKI MS, BRODY T, BROKSTEIN P, CELNIKER SE, CHERVITZ SA, COATES D, CRAVCHIK A, GABRIELIAN A, GALLE RF, GELBART WM, GEORGE RA, GOLDSTEIN LS, GONG F, GUAN P, HARRIS NL, HAY BA, HOSKINS RA, LI J, LI Z, HYNES RO, JONES SJ, KUEHL PM, LEMAIRE B, LITTLETON JT, MORRISON DK, MUNGALL C, O'FARRELL PH, PICKEREL OK, SHUE C, VOSSHALL LB, ZHANG J, ZHAO Q, ZHENG XH, LEWIS S. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*. 2000 März 24; 287(5461):2204-2215.
- [20] FENG S, CHEN JK, YU H, SIMON JA, SCHREIBER SL. Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science*. 1994 Nov 18; 266(5188):1241-1247.
- [21] CESARENI G, PANNI S, NARDELLI G, CASTAGNOLI L. Can we infer peptide recognition specificity mediated by SH3 domains? *FEBS Lett*. 2002 Feb 20; 513(1):38-44.
- [22] ZARRINPAR A, BHATTACHARYYA RP, LIM WA. The structure and function of proline recognition domains. *Sci. STKE*. 2003 Apr 22; 2003(179):RE8.
- [23] BALL LJ, KÜHNE R, SCHNEIDER-MERGENEY J, OSCHKINAT H. Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005 Mai 6; 44(19):2852-2869.
- [24] UNAIDS. AIDS epidemic update December 2009. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS); 2009.
- [25] MODROW S, FALKE D, TRUYEN U. Molekulare Virologie. Eine Einführung für Biologen und Mediziner. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
- [26] KNIPE DM, HOWLEY PM, GRIFFIN DE. Fields Virology 2 Vol Set. Parental Adviso. Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- [27] SIERRA S, KUPFER B, KAISER R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* 2005 Dez; 34(4):233-244.
- [28] MIYAUCHI K, KIM Y, LATINOVIĆ O, MOROZOV V, MELIKYAN GB. HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell*. 2009 Mai 1; 137(3):433-444.
- [29] JHAVERI MA, BROWNING SR, BUSH H, THORNTON A, GREENBERG RN. Comparison of 3-drug versus 4-drug and PI versus non-PI combinations as initial HAART: experience from 1998 to 2007. *J. Int Assoc Physicians AIDS Care (Chic Ill)*. 2009 Okt; 8(5):299-307.
- [30] TILTON JC, DOMS RW. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection [Internet]. *Antiviral Res*. 2009 Aug 14; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683546>
- [31] SAMSON M, LIBERT F, DORANZ BJ, RUCKER J, LIESNARD C, FARBER CM, SARAGOSTI S, LAPOUMEROULIE C, COGNAUX J, FORCEILLE C, MUYLDERMANS G, VERHOFSTEDE C, BURTONBOY G, GEORGES M, IMAI T, RANA S, YI Y, SMYTH RJ, COLLMAN RG, DOMS RW, VASSART G, PARMENTIER M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996 Aug 22; 382(6593):722-725.
- [32] ROTHERAM-BORUS MJ, SWENDEMAN D, CHOYNICK G. The past, present, and future of HIV prevention: integrating behavioral, biomedical, and structural intervention strategies for the next generation of HIV prevention. *Annu Rev Clin Psychol*. 2009; 5143-167.
- [33] RERKS-NGARM S, PITISUTTITHUM P, NITAYAPHAN S, KAEWKUNGWAL J, CHIU J, PARIS R, PREMSRI N, NAMWAT C, DE SOUZA M, ADAMS E, BENENSON M, GURUNATHAN S, TARTAGLIA J, MCNEIL JG, FRANCIS DP, STABLEIN D, BIRX DL, CHUNSUTTIWAT S, KHAMBOONRUANG C, THONGCHAROEN P, ROBB ML, MICHAEL NL, KUNASOL P, KIM JH. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med*. 2009 Dez 3; 361(23):2209-2220.
- [34] VON LAER D, HASSELMANN S, HASSELMANN K. Gene therapy for HIV infection: what does it need to make it work? *J Gene Med*. 2006 Juni; 8(6):658-667.
- [35] STRAYER DS, AKKINA R, BUNNELL BA, DROPULIC B, PLANELLES V, POMERANTZ RJ, ROSSI JJ, ZAIA JA. Current status of gene therapy strategies to treat HIV/AIDS. *Mol. Ther*. 2005 Juni; 11(6):823-842.
- [36] ROSSI JJ, JUNE CH, KOHN DB. Genetic therapies against HIV. *Nat. Biotechnol*. 2007 Dez; 25(12):1444-1454.
- [37] MAUTINO MR. Lentiviral vectors for gene therapy of HIV-1 infection. *Curr Gene Ther*. 2002 Feb; 2(1):23-43.
- [38] RANGA U, WOFFENDIN C, VERMA S, XU L, JUNE CH, BISHOP DK, NABEL GJ. Enhanced T cell engraftment after retroviral delivery of an antiviral gene in HIV-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998 Feb 3; 95(3):1201-1206.
- [39] KOHN DB, BAUER G, RICE CR, ROTHSCHILD JC, CARBONARO DA, VALDEZ P, HAO QL, ZHOU C, BAHNER I, KEARNS K, BRODY K, FOX S, HADEN E, WILSON K, SALATA C, DOLAN C, WETTER C, AGUILAR-CORDOVA E, CHURCH J. A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a re-sponsive element decoy gene into CD34(+) cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood*. 1999 Juli 1; 94(1):368-371.
- [40] LEVINE BL, HUMEAU LM, BOYER J, MACGREGOR R, REBELLO T, LU X, BINDER GK, SLEPUSHKIN V, LEMIALE F, MASCOLA JR, BUSHMAN FD, DROPULIC B, JUNE CH. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006 Nov 14; 103(46):17372-17377.
- [41] VAN LUNZEN J, GLAUNSINGER T, STAHRER I, VON BAEHR V, BAUM C, SCHILZ A, KUEHLCKE K, NAUNDORF S, MARTINIUS H, HERMANN F, GIROGLOU T, NEWRZELA S, MÜLLER I, BRAUER F, BRANDENBURG G, ALEXANDROV A, VON LAER D. Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus. *Mol. Ther*. 2007 Mai; 15(5):1024-1033.
- [42] MITSUYASU RT, MERIGAN TC, CARR A, ZACK JA, WINTERS MA, WORKMAN C, BLOCH M, LALEZARI J, BECKER S, THORNTON L, AKIL B, KHANLOU H, FINLAYSON R, MCFARLANE R, SMITH DE, GARSIA R, MA D, LAW M, MURRAY JM, VON KALLE C, ELY JA, PATINO SM, KNOP AE, WONG P, TODD AV, HAUGHTON M, FUERY C, MACPHERSON JL, SYMONDS GP, EVANS LA, POND SM, COOPER DA. Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells. *Nat. Med*. 2009 März; 15(3):285-292.
- [43] HAMMER D, WILD J, LUDWIG C, ASBACH B, NOTKA F, WAGNER R. Fusion of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1-derived glycine-alanine repeat to trans-dominant HIV-1 Gag increases inhibitory activities and survival of transduced cells in vivo. *Hum. Gene Ther*. 2008 Juni; 19(6):622-634.
- [44] ROMANI B, ENGELBRECHT S, GLASHOFF RH. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1 [Internet]. *J. Gen. Virol.* 2009 Okt 7; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812265>
- [45] ROETH JF, COLLINS KL. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2006 Juni; 70(2):548-563.
- [46] CHANG AH, O'SHAUGHNESSY MV, JIRIK FR. Hck SH3 domain-dependent abrogation of Nef-induced class I MHC down-regulation. *Eur. J. Immunol*. 2001 Aug; 31(8):2382-2387.
- [47] SAKSELA K, CHENG G, BALTIMORE D. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J*. 1995 Feb 1; 14(3):484-491.
- [48] PRUITT KD, TATISOVA T, MAGLOTT DR. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jan; 35(Database issue):D61-65.
- [49] PINNEY JW, DICKERSON JE, FU W, SANDERS-BEER BE, PTAK RG, ROBERTSON DL. HIV-host interactions: a map of viral perturbation of the host system. *AIDS*. 2009 März 13; 23(5):549-554.



- [50] BRASS AL, DYKXHOORN DM, BENITA Y, YAN N, ENGELMAN A, XAVIER RJ, LIEBERMAN J, ELLEDGE SJ. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*. 2008 Feb 15; 319(5865):921-926.
- [51] BUSHMAN FD, MALANI N, FERNANDES J, D'ORSO I, CAGNEY G, DIAMOND TL, ZHOU H, HAZUDA DJ, ESPESETH AS, KÖNIG R, BANDYOPADHYAY S, IDEKER T, GOFF SP, KROGAN NJ, FRANKEL AD, YOUNG JAT, CHANDA SK. Host cell factors in HIV replication: meta-analysis of genome-wide studies. *PLoS Pathog*. 2009 Mai; 5(5):e1000437.
- [52] TAYLOR SJ, SHALLOWAY D. An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature*. 1994 Apr 28; 368(6474):867-871.
- [53] FUMAGALLI S, TOTTY NF, HSUAN JJ, COURTNEIDGE SA. A target for Src in mitosis. *Nature*. 1994 Apr 28; 368(6474):871-874.
- [54] COURTNEIDGE SA, FUMAGALLI S. A mitotic function for Src? *Trends Cell Biol*. 1994 Okt; 4(10):345-347.
- [55] EBERSOLE TA, CHEN Q, JUSTICE MJ, ARTZT K. The quaking gene product necessary in embryogenesis and myelination combines features of RNA binding and signal transduction proteins. *Nat. Genet*. 1996 März; 12(3):260-265.
- [56] LUKONG KE, RICHARD S. Sam68, the KH domain-containing superSTAR. *Biochim. Biophys. Acta*. 2003 Dez 5; 1653(2):73-86.
- [57] BABER JL, LIBUTTI D, LEVENS D, TJANDRA N. High precision solution structure of the C-terminal KH domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, a c-myc transcription factor. *J. Mol. Biol*. 1999 Juni 18; 289(4):949-962.
- [58] JONES AR, SCHEDL T. Mutations in gld-1, a female germ cell-specific tumor suppressor gene in *Caenorhabditis elegans*, affect a conserved domain also found in Src-associated protein Sam68. *Genes Dev*. 1995 Juni 15; 9(12):1491-1504.
- [59] LIN Q, TAYLOR SJ, SHALLOWAY D. Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains. *J. Biol. Chem*. 1997 Okt 24; 272(43):27274-27280.
- [60] GALARNEAU A, RICHARD S. The STAR RNA binding proteins GLD-1, QKI, SAM68 and SLM-2 bind bipartite RNA motifs. *BMC Mol. Biol*. 2009; 10:47.
- [61] ITOH M, HAGA I, LI Q, FUJISAWA J. Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucleic Acids Res*. 2002 Dez 15; 30(24):5452-5464.
- [62] TREMBLAY GA, RICHARD S. mRNAs associated with the Sam68 RNA binding protein. *RNA Biol*. 2006 Apr; 3(2):90-93.
- [63] RHO J, CHOI S, JUNG C, IM D. Arginine methylation of Sam68 and SLM proteins negatively regulates their poly(U) RNA binding activity. *Arch. Biochem. Biophys*. 2007 Okt 1; 466(1):49-57.
- [64] DERRY JJ, RICHARD S, VALDERRAMA CARVAJAL H, YE X, VASIOUKHIN V, COCHRANE AW, CHEN T, TYNER AL. Sik (BRK) phosphorylates Sam68 in the nucleus and negatively regulates its RNA binding ability. *Mol. Cell. Biol*. 2000 Aug; 20(16):6114-6126.
- [65] MARTÍN-ROMERO C, SÁNCHEZ-MARGALET V. Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell. Immunol*. 2001 Sep 15; 212(2):83-91.
- [66] BABIC I, JAKYMIW A, FUJITA DJ. The RNA binding protein Sam68 is acetylated in tumor cell lines, and its acetylation correlates with enhanced RNA binding activity. *Oncogene*. 2004 Mai 6; 23(21):3781-3789.
- [67] CHEN, DAMAJ BB, HERRERA C, LASKO P, RICHARD S. Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and QKI: role of the KH domain. *Mol. Cell. Biol*. 1997 Okt; 17(10):5707-5718.
- [68] DI FRUSCIO M, CHEN T, RICHARD S. Characterization of Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2: SLM-1 is a Src substrate during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1999 März 16; 96(6):2710-2715.
- [69] BEDFORD MT, FRANKEL A, YAFFE MB, CLARKE S, LEDER P, RICHARD S. Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J. Biol. Chem*. 2000 Mai 26; 275(21):16030-16036.
- [70] QIU H, MILLER WT. Role of the Brk SH3 domain in substrate recognition. *Oncogene*. 2004 März 18; 23(12):2216-2223.
- [71] FINAN PM, HALL A, KELLIE S. Sam68 from an immortalised B-cell line associates with a subset of SH3 domains. *FEBS Lett*. 1996 Juli 1; 389(2):141-144.
- [72] WENG Z, THOMAS SM, RICKLES RJ, TAYLOR JA, BRAUER AW, SEIDEL-DUGAN C, MICHAEL WM, DREYFUSS G, BRUGGE JS. Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains. *Mol. Cell. Biol*. 1994 Juli; 14(7):4509-4521.
- [73] RICHARD S, YU D, BLUMER KJ, HAUSLADEN D, OLSZOWY MW, CONNELLY PA, SHAW AS. Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C gamma-1. *Mol. Cell. Biol*. 1995 Jan; 15(1):186-197.
- [74] BUNNELL SC, HENRY PA, KOLLURI R, KIRCHHAUSEN T, RICKLES RJ, BERG LJ. Identification of Itk/Tsk Src homology 3 domain ligands. *J. Biol. Chem*. 1996 Okt 11; 271(41):25646-25656.
- [75] ESPEJO A, CÔTÉ J, BEDNAREK A, RICHARD S, BEDFORD MT. A protein-domain microarray identifies novel protein-protein interactions. *Biochem. J*. 2002 Nov 1; 367(Pt 3):697-702.
- [76] ONEYAMA C, AGATSUMA T, KANDA Y, NAKANO H, SHARMA SV, NAKANO S, NARAZAKI F, TATSUTA K. Synthetic inhibitors of proline-rich ligand-mediated protein-protein interaction: potent analogs of UCS15A. *Chem. Biol*. 2003 Mai; 10(5):443-451.
- [77] VOGEL LB, FUJITA DJ. p70 phosphorylation and binding to p56lck is an early event in interleukin-2-induced onset of cell cycle progression in T-lymphocytes. *J. Biol. Chem*. 1995 Feb 10; 270(6):2506-2511.
- [78] TRAN T, HOFFMANN S, WIESEHAN K, JONAS E, LUGE C, ALADAG A, WILBOLD D. Insights into human Lck SH3 domain binding specificity: different binding modes of artificial and native ligands. *Biochemistry*. 2005 Nov 15; 44(45):15042-15052.
- [79] TAYLOR SJ, ANAFI M, PAWSON T, SHALLOWAY D. Functional interaction between c-Src and its mitotic target, Sam 68. *J. Biol. Chem*. 1995 Apr 28; 270(17):10120-10124.
- [80] SHEN Z, BATZER A, KOEHLER JA, POLAKIS P, SCHLESSINGER J, LYDON NB, MORAN MF. Evidence for SH3 domain directed binding and phosphorylation of Sam68 by Src. *Oncogene*. 1999 Aug 19; 18(33):4647-4653.
- [81] GUINAMARD R, FOUGEREAU M, SECKINGER P. The SH3 domain of Bruton's tyrosine kinase interacts with Vav, Sam68 and EWS. *Scand. J. Immunol*. 1997 Juni; 45(6):587-595.
- [82] TRÜB T, FRANTZ JD, MIYAZAKI M, BAND H, SHOELSON SE. The role of a lymphoid-restricted, Grb2-like SH3-SH2-SH3 protein in T cell receptor signaling. *J. Biol. Chem*. 1997 Jan 10; 272(2):894-902.
- [83] NAJIB S, SÁNCHEZ-MARGALET V. Sam68 associates with the SH3 domains of Grb2 recruiting GAP to the Grb2-SOS complex in insulin receptor signaling. *J. Cell. Biochem*. 2002; 86(1):99-106.
- [84] ANDREOTTI AH, BUNNELL SC, FENG S, BERG LJ, SCHREIBER SL. Regulatory intramolecular association in a tyrosine kinase of the Tec family. *Nature*. 1997 Jan 2; 385(6611):93-97.
- [85] LAWE DC, HAHN C, WONG AJ. The Nck SH2/SH3 adaptor protein is present in the nucleus and associates with the nuclear protein SAM68. *Oncogene*. 1997 Jan 16; 14(2):223-231.
- [86] LAZER G, PE'ER L, SCHAPIRA V, RICHARD S, KATZAV S. The association of Sam68 with Vav1 contributes to tumorigenesis. *Cell. Signal*. 2007 Dez; 19(12):2479-2486.
- [87] FUSAKI N, IWAMATSU A, IWASHIMA M, FUJISAWA JI. Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling. *J. Biol. Chem*. 1997 März 7; 272(10):6214-6219.
- [88] NAJIB S, MARTÍN-ROMERO C, GONZÁLEZ-YANES C, SÁNCHEZ-MARGALET V. Role of Sam68 as an adaptor protein in signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci*. 2005 Jan; 62(1):36-43.
- [89] RESNICK RJ, TAYLOR SJ, LIN Q, SHALLOWAY D. Phosphorylation of the Src substrate Sam68 by Cdc2 during mitosis. *Oncogene*. 1997 Sep; 15(11):1247-1253.
- [90] MATTER N, HERRLICH P, KÖNIG H. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature*. 2002 Dez 12; 420(6916):691-695.
- [91] CÔTÉ J, BOISVERT F, BOULANGER M, BEDFORD MT, RICHARD S. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol. Biol. Cell*. 2003 Jan; 14(1):274-287.
- [92] BABIC I, CHERRY E, FUJITA DJ. SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis. *Oncogene*. 2006 Aug 17; 25(36):4955-4964.
- [93] ISHIDATE T, YOSHIHARA S, KAWASAKI Y, ROY BC, TOYOSHIMA K, AKIYAMA T. Identification of a novel nuclear localization signal in Sam68. *FEBS Lett*. 1997 Juni 9; 409(2):237-241.
- [94] GRANGE J, BOYER V, FABIAN-FINE R, FREDJ NB, SADOUL R, GOLDBERG Y. Somatodendritic localization and mRNA association of the splicing regulatory protein Sam68 in the hippocampus and cortex. *J. Neurosci. Res*. 2004 März 1; 75(5):654-666.
- [95] TAYLOR SJ, SHALLOWAY D. Src and the control of cell division. *Bioessays*. 1996 Jan; 18(1):9-11.
- [96] CHEN T, BOISVERT FM, BAZETT-JONES DP, RICHARD S. A role for the GSG domain in localizing Sam68 to novel nuclear structures in cancer cell lines. *Mol. Biol. Cell*. 1999 Sep; 10(9):3015-3033.
- [97] HAEGEBARTH A, HEAP D, BIE W, DERRY JJ, RICHARD S, TYNER AL. The nuclear tyrosine kinase BRK/Sik phosphorylates and inhibits the RNA-binding activities of the Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2. *J. Biol. Chem*. 2004 Dez 24; 279(52):54398-54404.
- [98] LANG V, MÈGE D, SEMICHON M, GARY-GOUY H, BISMUTH G. A dual participation of ZAP-70 and scr protein tyrosine kinases is required for TCR-induced tyrosine phosphorylation of Sam68 in Jurkat T cells. *Eur. J. Immunol*. 1997 Dez; 27(12):3360-3367.
- [99] GILBERT C, BARABÉ F, ROLLET-LABELLE E, BOURGOIN SG, MCCOLL SR, DAMAJ BB, NACCACHE PH. Evidence for a role for SAM68 in the responses of human neutrophils to ligation of CD32 and to monosodium urate crystals. *J. Immunol*. 2001 Apr 1; 166(7):4664-4671.
- [100] LUKONG KE, LAROCQUE D, TYNER AL, RICHARD S. Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression. *J. Biol. Chem*. 2005 Nov 18; 280(46):38639-38647.
- [101] SÁNCHEZ-MARGALET V, MARTÍN-ROMERO C. Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway. *Cell. Immunol*. 2001 Juli 10; 211(1):30-36.
- [102] SÁNCHEZ-MARGALET V, NAJIB S. p68 Sam is a substrate of the insulin receptor and associates with the SH2 domains of p85 PI3K. *FEBS Lett*. 1999 Juli 23; 455(3):307-310.
- [103] WANG LL, RICHARD S, SHAW AS. P62 association with RNA is regulated by tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem*. 1995 Feb 3; 270(5):2010-2013.
- [104] PILLAY I, NAKANO H, SHARMA SV. Radicol inhibits tyrosine phosphorylation of the mitotic Src substrate Sam68 and retards subsequent exit from mitosis of Src-transformed cells. *Cell Growth Differ*. 1996 Nov; 7(11):1487-1499.

- [105] BARLAT I, MAURIER F, DUCHESNE M, GUITARD E, TOCQUE B, SCHWEIGHOFFER F. A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain. *J. Biol. Chem.* 1997 Feb 7; 272(6):3129-3132.
- [106] TAYLOR SJ, RESNICK RJ, SHALLOWAY D. Sam68 exerts separable effects on cell cycle progression and apoptosis. *BMC Cell Biol.* 2004 Jan 22; 5:5.
- [107] LI Q, HAGA I, SHIMIZU T, ITOH M, KUROSAKI T, FUJISAWA J. Retardation of the G2-M phase progression on gene disruption of RNA binding protein Sam68 in the DT40 cell line. *FEBS Lett.* 2002 Aug 14; 525(1-3):145-150.
- [108] LIU K, LI L, NISSON PE, GRUBER C, JESSEE J, COHEN SN. Neoplastic transformation and tumorigenesis associated with sam68 protein deficiency in cultured murine fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2000 Dez 22; 275(51):40195-40201.
- [109] BUSÀ R, PARONETTO MP, FARINI D, PIERANTOZZI E, BOTTI F, ANGELINI DF, ATTISANI F, VESPASIANI G, SETTE C. The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells. *Oncogene.* 2007 Juni 28; 26(30):4372-4382.
- [110] RICHARD S, VOGEL G, HUOT M, GUO T, MÜLLER WJ, LUKONG KE. Sam68 haploinsufficiency delays onset of mammary tumorigenesis and metastasis. *Oncogene.* 2008 Jan 17; 27(4):548-556.
- [111] CHEUNG N, CHAN LC, THOMPSON A, CLEARY ML, SO CWE. Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2007 Okt; 9(10):1208-1215.
- [112] SETTE C, MESSINA V, PARONETTO MP. Sam68: A New STAR in the Male Fertility Firmament [Internet]. *J. Androl.* 2009 Okt 29; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875495>
- [113] PARONETTO MP, MESSINA V, BIANCHI E, BARCHI M, VOGEL G, MORETTI C, PALOMBI F, STEFANINI M, GEREMIA R, RICHARD S, SETTE C. Sam68 regulates translation of target mRNAs in male germ cells, necessary for mouse spermatogenesis. *J. Cell Biol.* 2009 Apr 20; 185(2):235-249.
- [114] PARONETTO MP, ZALFA F, BOTTI F, GEREMIA R, BAGNI C, SETTE C. The nuclear RNA-binding protein Sam68 translocates to the cytoplasm and associates with the polysomes in mouse spermatocytes. *Mol. Biol. Cell.* 2006 Jan; 17(1):14-24.
- [115] GROSSMAN JS, MEYER MI, WANG YC, MULLIGAN GJ, KOBAYASHI R, HELFMAN DM. The use of antibodies to the polypyrimidine tract binding protein (PTB) to analyze the protein components that assemble on alternatively spliced pre-mRNAs that use distant branch points. *RNA.* 1998 Juni; 4(6):613-625.
- [116] PARONETTO MP, ACHSEL T, MASSIELLO A, CHALFANT CE, SETTE C. The RNA-binding protein Sam68 modulates the alternative splicing of Bcl-x. *J. Cell Biol.* 2007 März 26; 176(7):929-939.
- [117] BATSCHE E, YANIV M, MUCHART C. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006 Jan; 13(1):22-29.
- [118] GORLA L, CANTÙ M, MICCICHÈ F, PATELLI C, MONDELLINI P, PIEROTTI MA, BONGARZONE I. RET oncoproteins induce tyrosine phosphorylation changes of proteins involved in RNA metabolism. *Cell. Signal.* 2006 Dez; 18(12):2272-2282.
- [119] SERGEANT KA, BOURGEOIS CF, DALGLIESH C, VENABLES JP, STEVENIN J, ELLIOTT DJ. Alternative RNA splicing complexes containing the scaffold attachment factor SAFB2. *J. Cell. Sci.* 2007 Jan 15; 120(Pt 2):309-319.
- [120] TISSERANT A, KÖNIG H. Signal-regulated Pre-mRNA occupancy by the general splicing factor U2AF. *PLoS ONE.* 2008; 3(1):e1418.
- [121] RICHARD S, TORABI N, FRANCO GV, TREMBLAY GA, CHEN T, VOGEL G, MOREL M, CLÉROUX P, FORGET-RICHARD A, KOMAROVA S, TREMBLAY ML, LI W, LI A, GAO YJ, HENDERSON JE. Ablation of the Sam68 RNA binding protein protects mice from age-related bone loss. *PLoS Genet.* 2005 Dez; 1(6):e74.
- [122] SORIANO P, MONTGOMERY C, GESKE R, BRADLEY A. Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell.* 1991 Feb 22; 64(4):693-702.
- [123] LUKONG KE, RICHARD S. Motor coordination defects in mice deficient for the Sam68 RNA-binding protein. *Behav. Brain Res.* 2008 Juni 3; 189(2):357-363.
- [124] REDDY TR, XU W, MAU JK, GOODWIN CD, SUHASINI M, TANG H, FRIMPONG K, ROSE DW, WONG-STAAL F. Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nat. Med.* 1999 Juni; 5(6):635-642.
- [125] REDDY TR, XU WD, WONG-STAAL F. General effect of Sam68 on Rev/Rex regulated expression of complex retroviruses. *Oncogene.* 2000 Aug 17; 19(35):4071-4074.
- [126] REDDY TR, TANG H, XU W, WONG-STAAL F. Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of human immunodeficiency virus and type D retroviral mRNA. *Oncogene.* 2000 Juli 27; 19(32):3570-3575.
- [127] REDDY TR. A single point mutation in the nuclear localization domain of Sam68 blocks the Rev/RRE-mediated transactivation. *Oncogene.* 2000 Juni 22; 19(27):3110-3114.
- [128] ZHANG J, LIU Y, HENAO J, RUGELES MT, LI J, CHEN T, HE JJ. Requirement of an additional Sam68 domain for inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by Sam68 dominant negative mutants lacking the nuclear localization signal. *Gene.* 2005 Dez 19; 363:67-76.
- [129] SOROS VB, CARVAJAL HV, RICHARD S, COCHRANE AW. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by a dominant-negative mutant of Sam68 through sequestration of unspliced RNA at perinuclear bundles. *J. Virol.* 2001 Sep; 75(17):8203-8215.
- [130] LI J, LIU Y, PARK I, HE JJ. Expression of exogenous Sam68, the 68-kilodalton SRC-associated protein in mitosis, is able to alleviate impaired Rev function in astrocytes. *J. Virol.* 2002 Mai; 76(9):4526-4535.
- [131] COYLE JH, GUZIK BW, BOR Y, JIN L, EISNER-SMERAGE L, TAYLOR SJ, REKOSH D, HAMMARSKJÖLD M. Sam68 enhances the cytoplasmic utilization of intron-containing RNA and is functionally regulated by the nuclear kinase Sik/BRK. *Mol. Cell. Biol.* 2003 Jan; 23(1):92-103.
- [132] MODEM S, BADRI KR, HOLLAND TC, REDDY TR. Sam68 is absolutely required for Rev function and HIV-1 production. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(3):873-879.
- [133] LI J, LIU Y, KIM BO, HE JJ. Direct participation of Sam68, the 68-kilodalton Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway. *J. Virol.* 2002 Aug; 76(16):8374-8382.
- [134] HE J, HENAO-MEJIA J, LIU Y. Sam68 functions in nuclear export and translation of HIV-1 RNA [Internet]. *RNA Biol.* 2009 Okt 1; 6(4):Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535902>
- [135] MCLAREN M, ASAI K, COCHRANE A. A novel function for Sam68: enhancement of HIV-1 RNA 3' end processing. *RNA.* 2004 Juli; 10(7):1119-1129.
- [136] MCLAREN M, COCHRANE A. Mapping of determinants involved in the stimulation of HIV-1 expression by Sam68. *Virology.* 2009 März; 385(1):93-104.
- [137] MARSH K, SOROS V, COCHRANE A. Selective translational repression of HIV-1 RNA by Sam68DeltaC occurs by altering PABP1 binding to unspliced viral RNA. *Retrovirology.* 2008; 597.
- [138] HENAO-MEJIA J, HE JJ. Sam68 relocation into stress granules in response to oxidative stress through complexing with TIA-1. *Exp. Cell Res.* 2009 Nov 15; 315(19):3381-3395.
- [139] HENAO-MEJIA J, LIU Y, PARK I, ZHANG J, SANFORD J, HE JJ. Suppression of HIV-1 Nef translation by Sam68 mutant-induced stress granules and nef mRNA sequestration. *Mol. Cell.* 2009 Jan 16; 33(1):87-96.
- [140] YANG J, REDDY TR, TRUONG KT, SUHASINI M, WONG-STAAL F. Functional interaction of Sam68 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *Oncogene.* 2002 Okt 17; 21(47):7187-7194.
- [141] BADRI KR, MODEM S, GERARD HC, KHAN I, BAGCHI M, HUDSON AP, REDDY TR. Regulation of Sam68 activity by small heat shock protein 22. *J. Cell. Biochem.* 2006 Dez 1; 99(5):1353-1362.
- [142] MODEM S, REDDY TR. An anti-apoptotic protein, Hax-1, inhibits the HIV-1 rev function by altering its sub-cellular localization. *J. Cell. Physiol.* 2008 Jan; 214(1):14-19.
- [143] PELLETIER J, SIDHU S. Mapping protein-protein interactions with combinatorial biology methods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001 Aug; 12(4):340-347.
- [144] MATTHEAKIS LC, BHATT RR, DOWER WJ. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994 Sep 13; 91(19):9022-9026.
- [145] ROBERTS RW, SZOSTAK JW. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997 Nov 11; 94(23):12297-12302.
- [146] AMSTUTZ P, FORRER P, ZAHND C, PLÜCKTHUN A. In vitro display technologies: novel developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001 Aug; 12(4):400-405.
- [147] REGENMORTEL MHV, FAUQUET CM, BISHOP DHL. Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. illustrated edition. Academic Press; 1999.
- [148] HOFSCHEIDER P. Untersuchungen über 'kleine' E. coli K-12 Bacteriophagen M12, M13, und M20. *Z. Naturforsch.* 1963; (18):203-205.
- [149] NEWMAN J, SWINNEY HL, DAY LA. Hydrodynamic properties and structure of fd virus. *Journal of Molecular Biology.* 1977 Nov 5; 116(3):593-603.
- [150] RIECHMANN L, HOLLIGER P. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of E. coli. *Cell.* 1997 Juli 25; 90(2):351-360.
- [151] GEIDER K, KORNBERG A. Conversion of the M13 viral single strand to the double-stranded replicative forms by purified proteins. *J. Biol. Chem.* 1974 Juli 10; 249(13):3999-4005.
- [152] RUSSEL M. Moving through the membrane with filamentous phages. *Trends Microbiol.* 1995 Juni; 3(6):223-228.
- [153] MARVIN DA, HOHN B. Filamentous bacterial viruses. *Bacterial Rev.* 1969 Juni; 33(2):172-209.
- [154] SMITH GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985 Juni 14; 228(4705):1315-1317.
- [155] WILLATS WGT. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol. Biol.* 2002 Dez; 50(6):837-854.
- [156] VIEIRA J, MESSING J. Production of single-stranded plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 1987; 153:3-11.
- [157] SAMBROOK J, RUSSELL DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. Aufl. 0003. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory; 2000.
- [158] MÜLHARDT C. Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. 6. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag; 2008.
- [159] HANAHAN D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983 Juni 5; 166(4):557-580.
- [160] BIRNBOIM HC, DOLY J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24; 7(6):1513-1523.
- [161] LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15; 227(5259):680-685.

- [162] GRAHAM FL, VAN DER EB AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973 Apr; 52(2):456-467.
- [163] FÖRSTER T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*. 1948; 437(1-2):55-75.
- [164] STRYER L, HAUGLAND RP. Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1967 Aug; 58(2):719-726.
- [165] FIRTH AE, PATRICK WM. Statistics of protein library construction. *Bioinformatics*. 2005 Aug 1; 21(15):3314-3315.
- [166] ZSCHÖRNIG B. Identifikation eines SH3-Interaktionspartners des HIV-1 Transmembranproteins gp41 mittels Phagen Display. *Diplomarbeit am RIMMH*. 2004;
- [167] MÜRMACHER L. Selektion hoch affiner UEV-Domänen mittels Phagen-Display zur Intervention beim Tsg101/p6gag-vermittelten Abknospen von HIV-1. *Diplomarbeit am RIMMH*. 2004 Okt 25;
- [168] MCCONNELL SJ, DINH T, LE MH, SPINELLA DG. Biopanning phage display libraries using magnetic beads vs. polystyrene plates. *BioTechniques*. 1999 Feb; 26(2):208-210, 214.
- [169] HE L, OLSON DP, WU X, KARPOVA TS, McNALLY JG, LIPSKY PE. A flow cytometric method to detect protein-protein interaction in living cells by directly visualizing donor fluorophore quenching during CFP→YFP fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Cytometry A*. 2003 Okt; 55(2):71-85.
- [170] COLE C, BARBER JD, BARTON GJ. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2008 Juli 1; 36(Web Server issue):W197-201.
- [171] DOSZTÁNYI Z, CSIZMOK V, TOMPA P, SIMON I. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*. 2005 Aug 15; 21(16):3433-3434.
- [172] DOSZTÁNYI Z, CSIZMOK V, TOMPA P, SIMON I. The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins. *J. Mol. Biol.* 2005 Apr 8; 347(4):827-839.
- [173] KELLNER M. Generierung von SH3-Domänen mit verbesserter Affinität zu Sam68 mittels Phagen-Display-Technologie. *Diplomarbeit am RIMMH*. 2007;
- [174] HIIPAKKA M, POIKONEN K, SAKSELA K. SH3 domains with high affinity and engineered ligand specificities targeted to HIV-1 Nef. *J. Mol. Biol.* 1999 Nov 12; 293(5):1097-1106.
- [175] WEN W, MEINKOTH JL, TSIEH RY, TAYLOR SS. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*. 1995 Aug 11; 82(3):463-473.
- [176] HENDERSON BR, ELEFTHARIOU A. A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp. Cell Res.* 2000 Apr 10; 256(1):213-224.
- [177] GREENWOOD J, WILLIS AE, PERHAM RN. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J. Mol. Biol.* 1991 Aug 20; 220(4):821-827.
- [178] DI MARZO VERONESE F, WILLIS AE, BOYER-THOMPSON C, APPELLA E, PERHAM RN. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *J. Mol. Biol.* 1994 Okt 21; 243(2):167-172.
- [179] KANG AS, BARBAS CF, JANDA KD, BENKOVIC SJ, LERNER RA. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991 Mai 15; 88(10):4363-4366.
- [180] MALIK P, TERRY TD, GOWDA LR, LANGARA A, PETUKHOV SA, SYMMONS MF, WELSH LC, MARVIN DA, PERHAM RN. Role of capsid structure and membrane protein processing in determining the size and copy number of peptides displayed on the major coat protein of filamentous bacteriophage. *J. Mol. Biol.* 1996 Juli 5; 260(1):9-21.
- [181] LI SS. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem. J.* 2005 Sep 15; 390(Pt 3):641-653.
- [182] KAY BK, WILLIAMSON MP, SUDOL M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* 2000 Feb; 14(2):231-241.
- [183] LANDGRAF C, PANNI S, MONTECCHI-PALAZZI L, CASTAGNOLI L, SCHNEIDER-MERGNER J, VOLKMER-ENGERT R, CESARENI G. Protein interaction networks by proteome peptide scanning. *PLoS Biol.* 2004 Jan; 2(1):E14.
- [184] RUBINI C, RUZZA P, SPALLER MR, SILIGARDI G, HUSSAIN R, UDUGAMASOORIYA DG, BELLANDA M, MAMMI S, BORGOGNO A, CALDERAN A, CESARO L, BRUNATI AM, DONELLA-DEANA A. Recognition of lysine-rich peptide ligands by murine cortactin SH3 domain: CD, ITC and NMR studies [Internet]. *Biopolymers*. 2009 Nov 17; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19921743>
- [185] HARKIOLAKI M, LEWITZKY M, GILBERT RJC, JONES EY, BOURETTE RP, MOUCHIROUD G, SONDERMANN H, MOAREFI I, FELLER SM. Structural basis for SH3 domain-mediated high-affinity binding between Mona/Gads and SLP-76. *EMBO J.* 2003 Juni 2; 22(11):2571-2582.
- [186] GOLDBERG ME, DJAVADI-OHANIANCE L. Methods for measurement of antibody/antigen affinity based on ELISA and RIA. *Current Opinion in Immunology*. 1993; 5(2):278-281.
- [187] LILJOM K, OROSZ F, HORVÁTH L, OVÁDI J. Quantitative evaluation of indirect ELISA effect of calmodulin antagonists on antibody binding to calmodulin. *Journal of Immunological Methods*. 1991 Sep 20; 143(1):119-125.
- [188] WILLANDER M, AL-HILLI S. Analysis of biomolecules using surface plasmons. *Methods Mol. Biol.* 2009; 544201-229.
- [189] MAMMEN M, CHOI S, WHITESIDES GM. Polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: Auswirkungen auf das Design und die Verwendung multivalenter Liganden und Inhibitoren. *Angewandte Chemie*. 1998; 110(20):2908-2953.
- [190] ZEKE A, LUKÁCS M, LIM WA, REMÉNYI A. Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits. *Trends Cell Biol.* 2009 Aug; 19(8):364-374.
- [191] GUIET R, POINCLOUX R, CASTANDET J, MAROIS L, LABROUSSE A, LE CABEC V, MARIDONNEAU-PARINI I. Hematopoietic cell kinase (Hck) isoforms and phagocyte duties - from signaling and actin reorganization to migration and phagocytosis. *Eur. J. Cell Biol.* 2008 Sep; 87(8-9):527-542.
- [192] PUCHARCOS C, CASAS C, NADAL M, ESTIVILL X, DE LA LUNA S. The human intersectin genes and their spliced variants are differentially expressed. *Biochim. Biophys. Acta*. 2001 Okt 31; 1521(1-3):1-11.
- [193] O'BRYAN JP, MOHNEY RP, OLDHAM CE. Mitogenesis and endocytosis: What's at the INTERSECTION? *Oncogene*. 2001 Okt 1; 20(44):6300-6308.
- [194] REDDY S, DEVLIN R, MENAA C, NISHIMURA R, CHOI SJ, DALLAS M, YONEDA T, ROODMAN GD. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel peptide (OSF) that enhances osteoclast formation and bone resorption. *J. Cell. Physiol.* 1998 Dez; 177(4):636-645.
- [195] MANN A. Bedeutung cis-aktiver Sequenzmotive für die Rev-abhängige Expression eines quasi-lentiviralen Reportergens. *Diplomarbeit am RIMMH*. 2006;
- [196] BENEN T. Funktionelle Analyse cis-aktiver Sequenzen beim Rev-abhängigen RNA Export des HI-viralen gag-Gens. *Diplomarbeit am RIMMH*. 2006;
- [197] WAGNER R, GRAF M, BIELER K, WOLF H, GRUNWALT T, FOLEY P, UBERLA K. Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 2000 Nov 20; 11(17):2403-2413.
- [198] PASQUINELLI AE, POWERS MA, LUND E, FORBES D, DAHLBERG JE. Inhibition of mRNA export in vertebrate cells by nuclear export signal conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997 Dez 23; 94(26):14394-14399.
- [199] TRONO D, FEINBERG MB, BALTIMORE D. HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus. *Cell*. 1989 Okt 6; 59(1):113-120.
- [200] WOFFENDIN C, RANGA U, YANG Z, XU L, NABEL GJ. Expression of a protective gene-prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996 Apr 2; 93(7):2889-2894.
- [201] CARUSO M, SALOMON B, ZHANG S, BRISSON E, CLAVEL F, LOWY I, KLATZMANN D. Expression of a Tat-inducible herpes simplex virus-thymidine kinase gene protects acyclovir-treated CD4 cells from HIV-1 spread by conditional suicide and inhibition of reverse transcription. *Virology*. 1995 Jan 10; 206(1):495-503.
- [202] HUOT M, VOGEL G, RICHARD S. Identification of a Sam68 ribonucleoprotein complex regulated by epidermal growth factor [Internet]. *J. Biol. Chem.* 2009 Sep 17; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762470>
- [203] DUDENREDAKTION. Duden 01. Die deutsche Rechtschreibung: Das umfassende Standardwerk auf der Grundlage der neuen amtlichen Regeln: Band 1. 25. Aufl. Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus; 2009.
- [204] MCNAUGHT A, WILKINSON A. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997.
- [205] LIEBECQ C. Biochemical Nomenclature: And Related Documents : A Compendium 1992. 2. Aufl. Portland Press; 1992.
- [206] ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Molekularbiologie der Zelle. 4. Aufl. Wiley-VCH; 2003.
- [207] ADACHI A, GENDELMAN HE, KOENIG S, FOLKS T, WILLEY R, RABSON A, MARTIN MA. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 1986 Aug; 59(2):284-291.

## **Danksagung**

---

An erster Stelle möchte ich Herrn **Prof. Dr. Ralf Wagner** sehr herzlich dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe meine Promotionsarbeit durchzuführen, und dass er diese stets in jeder Hinsicht unterstützt hat.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Herbert Tschochner** dafür bedanken, dass er sich freundlicherweise bereit erklärt hat, die Arbeit an der NWF III zu vertreten und das Erstgutachten zu übernehmen.

Herrn **Prof. Dr. Hans Wolf** danke ich für die Unterstützung und das Mentoring während meiner gesamten Zeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene.

Besonders möchte ich mich außerdem bei **Dr. Christine Ludwig** für ihre exzellente Betreuung und stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Vielen Dank auch an **Michael Liss** und die Geneart AG für die Zusammenarbeit rund um die SH3-Bibliothek sowie insbesondere an **Kalle Saksela** für die intensiven Diskussionen zum Thema.

Ausserdem danke ich allen aktuellen und ehemaligen **Kolleginnen und Kollegen** der Arbeitsgruppe Wagner für Ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft, insbesondere den Laborkollegen **Alex, Tim** und **Tom**. Ein Extra-Dankeschön geht an **Alex** und **Jens** für Verbesserungsvorschläge und Tipps zur Arbeit.

Schliesslich gilt ein besonderes Dankeschön meiner **Familie** und meinen **Freunden**, und vor allem meiner lieben **Alexandra**, die mich während der ganzen Zeit begleitet haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.